

# Dissertation

## **Endokrine Wirkungen (anti)androgener Substanzen bei der Ploetze (*Rutilus rutilus*)**

zum Erlangen des akademischen Grades

doctor rerum naturalium

(Dr. rer. nat.)

im Fach Biologie

Mathematischen-Naturwissenschaftlichen Fakultät I  
der Humboldt-Universität zu Berlin

Diplom-Biologe, Christoph van Ballegooy

01.09.1966, Rees

Dekan: Praesident der Humboldt-Universität zu Berlin

Prof. Dr. Christoph Marksches

Dekan der Mathematischen-Naturwissenschaftlichen Fakultät I

Prof. Dr. Christian Limberg

Gutachter: 1. Prof. Dr. Werner Kloas  
2. Prof. Dr. Joerg Oehlmann  
3. Prof. Dr. Helmut Segner

eingereicht: 07.11.2007

Datum der Promotion: 18.02.2008

The man thinks,  
The horse thinks,  
The sheep thinks,  
The cow thinks,  
The dog thinks.  
The fish doesn't think.  
The fish is mute.  
Expressionless.  
The fish doesn't think,  
Because the fish knows  
Everything.

The fish knows  
Everything.

Iggy Pop "This is a film"  
in „Arizona Dream“

Zusammenfassung	1
Summary	1
1 Einleitung	9
1.1 Was sind „endocrine disruptors“ (EDs)?	9
1.1.1 Stand der ED-Forschung	9
1.1.2 Forschung im EU-Projekt COMPREND	10
1.2 Hormonsystem	11
1.2.1 Endokriner Regelkreis am Beispiel der Sexualsteroid	12
1.3 Ziele der Arbeit	14
2 Material und Methoden	15
2.1 Charakterisierung der Bindung von (anti)androgenen Substanzen (AACs) an Androgenrezeptoren mittels Radiorezeptorassay (RARA)	15
2.1.1 Kinetische Experimente	15
2.1.2 Konkurrenzexperimente	15
2.1.3 Arbeitslösungen und Chemikalien	16
2.1.4 Gewebeentnahme und Verarbeitung	17
2.1.5 Trennung von rezeptorgebundenen und freiem Hormon	17
2.1.6 Kinetische Experimente am Androgenrezeptor	18
2.2 Tiere, Haltung und Versuchsdurchführungen der in vivo Expositionen mit larvalen <i>R. rutilus</i>	18
2.2.1 Mortalität	18
2.2.2 In vivo Exposition 1 (EX1) und Exposition 2 (EX2) mit larvalen <i>R. rutilus</i>	18
2.2.3 Geschlechterbestimmung	19
2.2.4 Bestimmung der Genexpression in Geweben larvaler <i>R. rutilus</i> mittels der Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)	19
2.2.5 Histologie	26
2.3 Tiere, Haltung und Versuchsdurchführung der in vivo Exposition (EX3) mit adulten <i>R. rutilus</i>	26
2.3.1 Mortalität	26
2.3.2 In vivo Exposition 3 (EX3) mit adulten <i>R. rutilus</i>	27
2.3.3 Bestimmung der Genexpression in Geweben adulter <i>R. rutilus</i> mittels der Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)	27
2.3.4 Enzymassay	27
2.3.5 Bindung der Sexualsteroid	29
2.4 Statistik	25
2.4.1 Gewicht, Länge und Geschlechterverhältnis der Fische	31
2.4.2 Genexpression mittels RT-PCR	25
2.4.3 Enzymbestimmungen und Sexualsteroidspiegel im Blut	32
3 Ergebnisse	34
3.1 Charakterisierung der Bindung der (anti)androgenen Substanzen (AAC's) an Androgenrezeptoren mittels Radiorezeptorassay	34

3.1.1 Kinetische Experimente	34
3.1.2 Konkurrenzexperimente	37
3.2 In vivo Expositionen larvaler <i>R. rutilus</i>	41
3.2.1 Mortalitätsraten der in vivo Expositionen 1 (EX1) und 2 (EX2)	41
3.2.2 Totallängen	43
3.2.3 Gewicht	45
3.2.4 Geschlechtsdifferenzierung	46
3.2.5 Genexpression mittels Reverse Transkriptase-Polymerase-Ketten-Reaktion (RT-PCR)	48
3.2.6 Histologie	56
3.3 In vivo Exposition mit adulten <i>R. rutilus</i> (EX3)	65
3.3.1 Mortalitätsraten der in vivo Exposition (EX3)	65
3.3.2 Reverse Transkriptase-Polymerase-Ketten-Reaktion (RT-PCR)	65
3.3.3 Enzymbestimmungen	72
3.3.4 Sexualsteroidspiegel im Blut von 2+ <i>R. rutilus</i> nach in vivo Kurzzeitexposition mit AACs	73
4 Diskussion	76
4.1 Charakterisierung der Bindung (anti)androgener Substanzen (AACs) an die Androgenrezeptoren (AR) mittels Radiorezeptorassay (RARA)	76
4.1.1 Kinetische Experimente	77
4.1.2 Konkurrenzexperimente	77
4.2 In vivo Expositionen mit larvalen <i>R. rutilus</i>	78
4.2.1 Mortalität	78
4.2.2 Gesamtlänge	78
4.2.3 Gewicht	79
4.2.4 Geschlechtsdifferenzierung	79
4.2.5 Genexpressionen der Biomarker bei den larvalen <i>R. rutilus</i>	81
4.2.6 Histologie	82
4.3 In vivo Exposition mit adulten <i>R. rutilus</i>	85
4.3.1 Mortalität	85
4.3.2 Genexpression der Biomarker bei adulten <i>R. rutilus</i>	85
4.3.3 Enzymassays nach in vivo Kurzzeitexposition mit AACs	85
4.3.4 Sexualsteroidspiegel im Blut von 2+ <i>R. rutilus</i> nach in vivo Kurzzeitexposition mit AACs	86
4.4 Fazit	87
5 Aussichten	88
Referenzen	89

## Zusammenfassung

Substanzen, die durch ihr hormonell wirksames Potenzial mit dem Hormonsystem interagieren und adverse Effekte auf die Reproduktion von Invertebraten und Vertebraten ausüben können, erlangten in den letzten Jahrzehnten große Aufmerksamkeit. Viele dieser Substanzen reduzieren die Fertilität oder die Fekundität, führen zu Abnormalitäten in der Ontogenese oder im Verhalten der Tiere und haben Einfluss auf die Geschlechterverhältnisse. In der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene Aspekte dieses Themengebietes bearbeitet. Das in Europa endemisch vorkommende Rotaugen (Rutilus rutilus), ein Süßwasserfisch, wurde als Modelltier für den Nachweis von (anti)androgenen Effekten auf aquatisch lebende Organismen etabliert. Zum Nachweis der (anti)androgenen Wirkmechanismen wurden die Tiere mit Modellsubstanzen aus drei verschiedenen Gruppen exponiert. Aus der Gruppe der Substanzen mit potenziell androgener Wirkung wurden Triphenylzinn (TPT) und Methyltestosteron (MT) verwendet, aus der Gruppe der Antiandrogene Vinclozolin (VIN) und Cyproteronacetat (CYP) und aus der Gruppe der Aromatasehemmer, und somit potenziell androgener Wirkung, Letrozol (LET) und Fenarimol (FEN). Feedbackmechanismen auf die Hypothalamus-Hypophysen-Gonaden-Achse (mRNA-Expression des Luteinisierenden Hormons, des Follikel stimulierenden Hormons und der Aromatase), mRNA-Expression potentieller Biomarker in der Leber (Androgen-Rezeptor-mRNA, Östrogen-Rezeptor-mRNA), Sexsteroidspiegel im Blutplasma (17 $\beta$ -Östradiol und 11-keto-Testosteron), Enzymaktivitäten im Gehirn (Aromatase), Histologie der Gonaden, Totallänge, Gewicht und Geschlechterverteilung wurden als Endpunkte analysiert, um adverse Effekte auf die Reproduktionsbiologie von *R. rutilus* zu zeigen. Die untersuchten Endpunkte eigneten sich zum Nachweis verschiedener Wirkmechanismen, besonders die mRNA-Expression in der Leber und die Sexsteroidspiegel im Blut. Als besonders sensitiv zeigte sich die histologische Untersuchung der Gonaden. Hierbei zeigte sich, dass die Exposition mit AACs zu fundamentalen adversen Schädigungen der Gonaden führt. Ebenso wurde eine Beeinflussung der Hypothalamus-Hypophysen-Gonaden-Achse durch alle eingesetzten AACs festgestellt. Es zeigte sich, dass in den frühen Stadien der Ontogenese Androgene ebenso eine entscheidende Rolle für die Entwicklung der Gonaden spielen wie sie bisher vor allen Östrogenen zugeschrieben wurden.

## Summary

Substances that are able to interact with the endocrine system and cause adverse effects on the reproduction of invertebrates and vertebrates have gained much attention over the last few decades. Many of these substances reduce fertility or fecundity, lead to developmental abnormalities or abnormalities in the behaviour of animals and have an impact on sex ratios. The present study examines various aspects of these topics. The roach (*Rutilus rutilus*), a freshwater fish endemic in Europe, was established as a model animal for the detection of (anti)androgenic effects on aquatic organisms. For examination of the (anti)androgenic action, the animals were exposed to model compounds from three different groups: triphenyltin (TPT) and methyltestosterone (MT) from the group of substances with potentially androgenic effect, vinclozolin (VIN) and cyproteronacetate (CYP) from the group of antiandrogens, and letrozol (LET) and fenarimol (FEN) from the group of aromatase inhibitors, which thus have a potentially androgenic effect. Feedback mechanisms on the hypothalamus-pituitary-gonad-axis (mRNA expression of luteinising hormone, follicle stimulating hormone and aromatase), mRNA expression

of potential biomarkers in the liver (androgen receptor mRNA, oestrogen receptor mRNA), steroid levels in the blood plasma (17 $\beta$ -oestradiol and 11-ketotestosterone), enzyme activity in the brain (aromatase), histology of the gonads, total length, weight and sex ratios were analysed as endpoints to show adverse effects on the reproductive biology of *R. rutilus*. The studied endpoints are suitable for the detection of different modes of action, especially the mRNA expression in the liver and the steroid levels in blood. The histological examination of the gonads proved to be especially sensitive with the exposure to AACs to resulting in fundamental adverse damages to the gonads. Similarly, an affect on the hypothalamus-pituitary-gonad-axis by all used AACs was determined as well. It was ascertained that - in the early stages of ontogeny - androgens play as crucial of a role in the development of the gonads as previously attributed primarily to oestrogens.

# 1 Einleitung

## 1.1 Was sind „endocrine disruptors“ (EDs)?

Ab den 20er Jahren des letzten Jahrhunderts nahm die Produktion von industriell produzierten Chemikalien drastisch zu. Der Umgang der Menschheit mit diesen Chemikalien war zunächst sehr sorglos. Dadurch gelangten Unmengen vom Menschen geschaffener Substanzen oder deren Abbauprodukte in die Umwelt und über verschiedene Eintragswege in das aquatische System. Als die US Amerikanerin Rachel Carson 1962 zusammen mit ihrer Assistentin Bette Haney das Buch „Silent Spring“ veröffentlichte, in dem sie den Missbrauch synthetischer Pflanzenschutzmittel vor allem von Dichlordiphenyltrichloräthan (DDT) anprangerte, war dies ein Anstoß in zahlreichen Industriestaaten zur Schaffung von bis zu diesem Zeitpunkt noch nicht vorhandenen Gesetzen zur Handhabung von Pestiziden. So wurde z.B. 1974 das Umweltbundesamt (UBA) in Deutschland gegründet und zwanzig Jahre nach der Veröffentlichung des Buches 1982 wurde auf dem "Workshop über globalen Pestizidhandel" (Workshop on the global pesticide trade) in Penang/Malaysia das internationale Pesticide Action Network (PAN) gegründet.

Substanzen, die in die Umwelt eingebracht wurden, gelangten immer mehr in das Bewusstsein der Wissenschaft. Zunächst befassten sich die meisten Forschungen mit toxischen/letalen Wirkungen von Stoffen auf einen gesunden Organismus. Häufig standen dabei nur Konzentrationen von Substanzen im Mittelpunkt der Untersuchungen, bei denen 50% der behandelten Tiere starben (lethal concentration 50% (LC<sub>50</sub>)) um aus den Ergebnissen eine Risikoabschätzung für Chemikalien festzulegen (Lloyd und Tooby, 1979; Bucke und Waterman, 1988). Dies erwies sich aber als nicht ausreichend, da einige Substanzen in weit niedrigeren Konzentrationen das Hormonsystem beeinflussen können und somit den Organismus schädigen ohne eine relevante Toxizität auf den Organismus zu besitzen (Colborn und Clement, 1992; Colborn et al., 1993; McLachlan und Arnold, 1996). Auf der EU-Konferenz in Weybridge 1996 definierten dann über 70 Vertreter aus Wissenschaft und Umweltorganisationen den Begriff „Endocrine Disruptors“ als: "An endocrine disrupter is a substance or mixture that alters function(s) of the endocrine system and consequently causes adverse health effects in an intact organism, or its progeny, or (sub)populations." Dies bedeutet, dass eine exogene Substanz oder eine Mischung von Stoffen, die die Funktion des endokrinen Systems ändert und infolgedessen gesundheitsschädigende Wirkung in einem gesunden Organismus, seiner Nachkommenschaft oder einer (Sub)Population hervorruft, als „endocrine disruptor“ (ED) bezeichnet wird.

### 1.1.1 Stand der ED-Forschung

In den letzten drei Dekaden nahm die Anzahl der Veröffentlichungen hinsichtlich der Wirkung und der Wirkmechanismen von ED, die in niedrigen Konzentrationen in die Umwelt gelangten, ständig zu. Ein besonderer Fokus fiel jetzt auf Substanzen, die das Hormonsystem auf verschiedenen Ebenen beeinflussten ohne eine direkte Toxizität zu besitzen. Zunächst erlangten Stoffe das Interesse der internationalen Forschungsgruppen, von denen man oestrogene oder antioestrogene Wirkungen auf das Hormonsystem vermutete. Hierbei konzentrierten sich die Untersuchungen zunächst auf den für den Menschen unmittelbar relevanten Substanzen und deren Wirkung auf das menschliche Hormonsystem (Colborn et al., 1993). Deshalb scheint es auch nicht weiter ver-

wunderlich, das viele Versuche an Saeugetieren durchgefuehrt und validiert wurden (vom Saal, 1978; Risher et al., 1987). Erst spaeter erkannte man die Notwendigkeit die Forschung auch auf aquatisch lebende Tiere zu erweitern, da ein Grobteil dieser Substanzen in die Oberflaechengewaesser gelangte und dort auf das Oekosystem Einfluss nahm. Nur wenige Arbeiten wurden zu aquatisch lebenden Invertebraten erstellt. Hier sind vor allem die Arbeiten der Arbeitsgruppe um Ole Kusk in Daenemark zu erwaehnen, denen es gelang einen Test zur Wirkung von umweltrelevanten Substanzen an verschiedenen Copepoden fuer die OECD zu validieren (Kusk und Wollenberger, 2007) und die Arbeiten der Arbeitsgruppe um Joerg Oehlmann an der Johann-Wolfgang-von-Goethe-Universitaet in Frankfurt am Main, die grundlegende Forschung an der im Suedwasser lebenden Apfelschnecke (*Marisa cornuarietis*) als einem Vertreter der Invertebraten im Bereich der ED geleistet haben (Oehlmann et al., 2000; Tillmann et al., 2001; Oehlmann et al., 2006). Die meisten Untersuchungen jedoch wurden an Vertretern der Vertebraten durchgefuehrt. In der Arbeitsgruppe „ED“ am Leibniz-Institut fuer Gewaesseroekologie und Binnenfischerei in Berlin (IGB) wurde diesbezuglich Grundlagenforschung betrieben und der Suedafrikanische Krallenfrosch, *Xenopus laevis*, als ein Modell zur Detektierung von endokrin wirksamen Substanzen auf aquatisch lebende Amphibien etabliert (Kloas, 2002). Die meisten Untersuchungen zu ED wurden mit oekotoxikologischen Modellfischen wie dem japanischen Reiskaerpfing (*Orizias latipes*), dem Zebrabaerbling (*Danio rerio*) oder der Dickkopfelritze (*Pimephales promelas*) durchgefuehrt aber kaum mit einheimischen frei lebenden Arten. Eine Ausnahme bilden die Arbeiten von Katsiadaki am dreistachligen Stichling (*Gasterosteus aculeatus*) (Katsiadaki et al., 2002 & 2006). Aber nur wenige beschaeftigten sich mit der Auswirkung von Chemikalien auf das Geschlechterverhaeltnis, das Hormonsystem, die Reproduktion oder die Population bei endemisch vorkommenden Fischen (van Aerle et al., 2001; Jobling et al., 2002; Liney et al., 2005; Katsu et al., 2007).

### 1.1.2 Forschung im EU-Projekt COMPREND0

Es gibt nur relativ wenige Untersuchungen zu Substanzen, die androgene und/oder antiandrogene Wirkungen aufweisen. Im Rahmen des EU-Forschungsprojektes COMPREND0 wurden ueber 20 Modellorganismen wie Prosobranchier (Vorderkiemerschnecken: *Marisa cornuarietis*, *Potamopyrgus antipodarum*, *Nassarius reticulatus*), Crustaceen (Krebstiere: *Acartia tonsa*, *Hyalella azteca*), Echinodermen (Stachelhaeuter: *Antedon mediterranea*, *Paracentrotus lividus*), Amphibien (*Xenopus laevis*), Fische (*Rutilus rutilus*, *Pimephales promelas*), Voegel (*Gallus domesticus*) und Saeugetiere (*Rattus norvegicus*) sowie menschliche Zelllinien mit bis zu 15 Testsubstanzen (Mono-, Di-, Tributylzinn, Triphenylzinn, Fenarimol, Vinclozolin, Linuron, Diuron, 4,4'-Dichlordiphenyldichlorethylen, Prochloraz, Methyltestosteron, Letrozol, Cyproteronazetat, Flutamid) und nativen Umweltproben als Beispiel fuer komplexe Mischungen mit meist mehreren Testkonzentrationen in dreizehn verschiedenen Laboratorien aus neun europaeischen Laendern exponiert. Endpunkte aus den Bereichen Vitalitaet (Gewicht, Wachstum, Sterblichkeit), Reproduktion (Geschlechterverhaeltnis, Reifegrad der Keimdruesen, Groesse der Sexualdruesen und Geschlechtsorgane, Missbildungen, Vermaennlichung weiblicher Tiere, Spermienbeweglichkeit und -qualitaet, Stoerung der Spermato- und Oogenese, Befruchtungserfolg, Anzahl produzierter Eier/Gelege, Gelegegroesse), Entwicklung (Schlupferfolg, Larvalentwicklung, Regeneration, Zeit bis zur sexuellen Reife) und Physiologie (Sexualsteroid-Konzentrationen, Vitellogenin-Konzentrationen, Enzym-Aktivitaeten, Apoptose, Proteingehalt) wurden, sofern anwendbar, bei allen Testmodellen hinsichtlich adverser Wirkungen dieser potentiellen ED mit androgenen/antiandrogenen Eigenschaften analysiert.



In Zusammenhang mit diesem Projekt bestand die Aufgabe am IGB Methoden zur Detektion von endokrin wirksamen (anti)androgenen Substanzen (AACs) an einem in Europa endemisch vorkommenden Süßwasserfisch zu erforschen und zu etablieren. Die Wahl fiel auf das ubiquitär verbreitete und einmal im Jahr laichende Rotaugen, *Rutilus rutilus*.

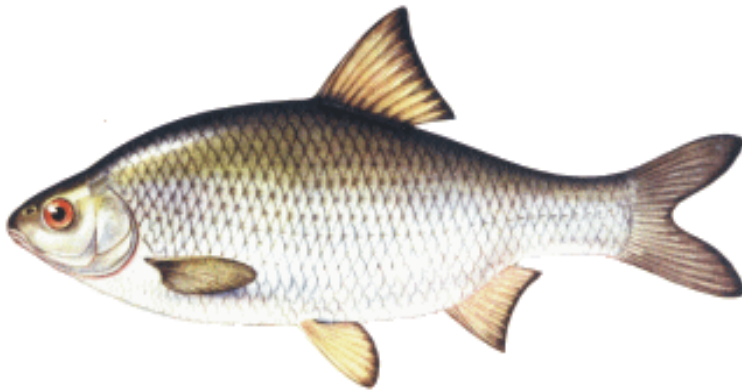


Abb. 1: Rotaugen (*Rutilus rutilus*)

Hiermit verbunden waren die Entwicklung neuer Untersuchungstechniken und Hälterungsbedingungen, da die hier vorliegende Arbeit sich erstmalig mit der Aufzucht von *R. rutilus* in einem semistatischen System beschäftigte. Bei den Endpunktbestimmungen wurde darauf Wert gelegt, dass diese mit den bis dato bekannten Ergebnissen für diese Art und der Gruppe der Teleostee und auch mit dem innerhalb des COMPRENDO-Projektes gewählten anderen Modellorganismen und Parametern vergleichbar waren. Die hier vorliegende Arbeit soll somit zu einem besseren Verständnis der Wirkungen von AACs auf das Hormonsystem des heimischen Fisches *R. rutilus* beitragen.

## 1.2 Hormonsystem

Das Hormonsystem ist ein sehr konservatives System im Tierreich. Es gehört neben dem Immunsystem und dem Nervensystem zu den wichtigsten Kommunikationssystemen des Körpers. Es reguliert bei Fischen verschiedene physiologische Vorgänge wie z.B. Osmoregulation, Ontogenese, Geschlechtsdifferenzierung oder Reproduktion. Die Regulation erfolgt über Hormone, die in zwei große Gruppen eingeteilt sind. Die eine Gruppe ist die der lipophilen Hormone, zu denen die Steroide und die Schilddrüsenhormone zählen, die andere ist die der hydrophilen Hormone, zu denen Catecholamine und Peptidhormone zählen. Der größte Unterschied zwischen diesen beiden besteht darin, dass hydrophile Hormone Rezeptoren die an der Oberfläche der Zielzellen lokalisiert sind, binden und dadurch eine Signaltransduktionskette in Gang setzen (Norris, 1997). Lipophile Hormone hingegen vermitteln ihre differenzierte Wirkung auf die Genexpression über eine Bindung an intrazelluläre Rezeptoren (Beato et al., 1995). Die meisten der bekannten ED sind in ihrer Wirkung den Sexualsteroiden ähnlich, wirken antagonistisch oder beeinflussen deren Synthese und Bioverfügbarkeit. Daher soll hier am Beispiel der Bildung und Ausschüttung der Sexualsteroiden das komplexe System der Hypothalamus-Hypophysen-Gonaden-Achse (HHG) erläutert werden.

### 1.2.1 Endokriner Regelkreis am Beispiel der Sexualsteroiden bei Fischen

Die Synthese, der Transport, die Rezeptorbindung und die Wirkung der Sexualsteroiden unterliegen einer komplexen hierarchischen Kontrolle (s. Abb.2). Oberstes Zentrum dieses endokrinen Regelkreises ist der Hypothalamus, welcher im Zentralen Nervensystem (ZNS) liegt. Die Zellen des Hypothalamus sezernieren das Gonadotropin-releasing Hormon (GnRH), welches zur Hypophyse gelangt. Dort bewirkt es in den Zellen des Hypophysenvorderlappen (HVL) die Freisetzung der Gonadotropine. Diese sind das Follikel stimulierende Hormon (FSH) und das Luteinisierende Hormon (LH). Bei beiden handelt es sich um glandotrope (Glandula = Drüse) Hormone. Das heißt, es handelt sich nicht um Hormone, die direkt auf die Zielzellen einwirken (effektorische Hormone), sondern um Hormone, die ihrerseits auf Hormondrüsen wirken wie z. B. die Gonaden (Ovarien und Testes). Die Gonadotropine stimulieren die Bildung von Sexualsteroiden in den Gonaden. In den Ovarien stimulieren sie dort vor allem die Bildung von  $17\beta$ -Estradiol (E<sub>2</sub>). Zu diesem Zweck wird das hauptsächlich in den Thekazellen gebildete Testosteron (T) in die Granulosazellen transportiert, dort durch das Enzym Aromatase (ARO) in E<sub>2</sub> umgewandelt, und in den Blutstrom abgegeben, wo 90-95% des E<sub>2</sub> zum Transport an das Sexualsteroid bindende Protein (SBP) gebunden werden. Ein erhöhter E<sub>2</sub>-Spiegel wirkt in negativer Rückkopplung auf Hypothalamus und Hypophyse zurück und vermindert dort die Freisetzung von GnRH bzw. FSH und LH. Freies E<sub>2</sub> im Blut kann an der Zielzelle aufgrund seiner lipophilen Struktur die Zellmembran passieren und im Cytosol an den Oestrogenrezeptor binden. Dieser Hormon/Rezeptor-Komplex wandert in den Zellkern, wo ein Dimer dieser Komplexe durch Bindung an E<sub>2</sub>-responsive Elemente (ERE) der DNA die Transkription E<sub>2</sub>-spezifischer Gene auslöst (Beato et al., 1995). Die Steuerung der Androgenfreisetzung in den Testes der männlichen Fische wird analog zum weiblichen Organismus durch die beschriebene hierarchische Struktur und die integrierten Feedback-Mechanismen geleistet. Die Gegenwart von FSH und LH führt in den interstitiellen (Leydigschen) Zellen (IZ) der Hoden zur Produktion der Androgene, bei Fischen sind das hauptsächlich T und 11-Keto-Testosteron (11-KT). Androgene binden an das gleiche SBP wie E<sub>2</sub> und die Vermittlung der Wirkung an den Zielzellen über cytosolische Androgenrezeptoren und entsprechende DNA-Interaktionen erfolgt analog zu den Oestrogenen. Es ist allerdings auch zu betonen, dass auch Androgene in den Ovarien und Oestrogene in den Testes gebildet werden, welche physiologische Funktionen in der Reifung der Gonaden erfüllen (Schulz und Miura, 2002).

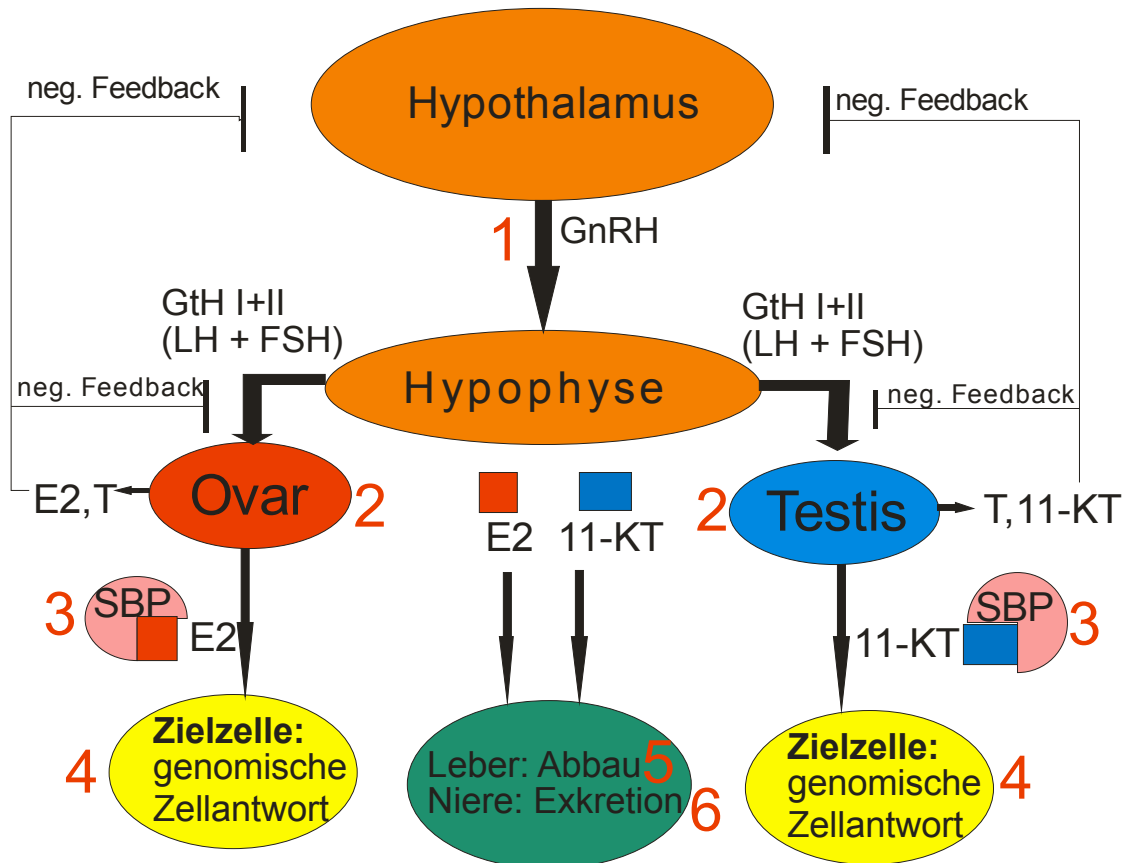


Abb. 2: Allgemeiner endokriner Regelkreis am Beispiel der Sexualsteroiden bei Fischen. Schematische Darstellung der Hypothalamus-Hypophysen-Gonaden-Achse. GnRH: Gonadotropin-releasing Hormon, E2: 17 $\beta$ -Oestradiol, T: Testosteron, 11-KT: 11-Keto-Testosteron, SBP: Sexualsteroid bindendes Protein, GtH I+II: Gonadotropin I + II, FSH (= GtH I): Follikel stimulierendes Hormon; LH (= GtH II): Luteinisierendes Hormon.

#### 1.2.1.1 Beeinflussung des endokrinen Regelkreises durch ED

Die schematische Darstellung des Hormonsystems (Abb. 2) zeigt wie komplex die Bildung, Ausschüttung, Bindung und Regulation der Steroidsynthese ist. Daher ist es nicht verwunderlich, dass EDs an verschiedenen Stellen dieser HHG angreifen koennen und den physiologischen Ablauf kurzfristig oder nachhaltig schaedigen koennen. So kann es zum Beispiel (vgl. Abb. 2) zu einer Hemmung der GnRH-Ausschüttung (1) im zentralen Nervensystem (ZNS) kommen (Amano et al., 2007). Die Bildung und/oder Sezenierung der Steroide in den Gonaden koennen behindert werden (2) (Evanson & van der Kraak, 2001; Opitz et al., 2002). Die Bindung an das SBP wird unterbunden (3), indem ED selbst an dieses binden (Kloas et al., 2000) oder es koennen Stoerungen des AR in den Zielzellen durch diese hervorgerufen werden (4) (Bauer et al., 1998; Baatrup & Junge, 2001). Eine Beeinflussung des endokrinen Regelsystem kann z. B. eine anormale Proteinbildung zur Folge haben und zu Auswirkungen bei der Sexualdifferenzierung und Gametogenese fuehren (van Aerle et al., 2001; Vinggaard et al., 2005). Weiterhin koennen Stoerungen der hormonabbauenden Aktivitaeten in der Leber (5) oder der Ausscheidung ueber die Niere (6) auftreten (Gunderson et al., 2001).

### 1.3 Ziele der Arbeit

Viele ED, die mit dem Hormonsystem von Invertebraten und Vertebraten interagieren, sind synthetische Substanzen (z.B. Medikamente, Düngemittel, Pestizide, Herbizide, Fungizide, Bleichmittel, Weichmacher oder andere industrielle Abfälle, wie zum Beispiel polychlorierte Kohlenwasserstoffe (PAK) oder polychlorierte Biphenyle (PCBs)). Die meisten dieser Substanzen sind lipophil und wurden vor allem hinsichtlich (anti)oestrogenen Wirkungen untersucht. Neueste Untersuchungen deuten darauf hin, dass auch eine potentielle Belastung der Umwelt mit (anti)androgenen Substanzen vorliegen könnte (Christiaens et al., 2005; Urbatzka et al., 2007). Es ist daher von großer Bedeutung, ED mit einer voraussichtlich (anti)androgenen Wirkung auch an einem einheimischen Fisch zu untersuchen. Um umfassende Aussagen über den Einfluss von AACs machen zu können, war es notwendig Versuche sowohl in vivo als auch in vitro durchzuführen. In vitro Versuche haben den Vorteil, Wirkungen von AACs ohne die Beeinflussung durch andere mögliche endogene Gegenregulationen aufzeigen zu können, doch ist es ebenso wichtig, die Auswirkungen von AACs auf die Fische im Ganzen zu betrachten, da auch unsere Umwelt holistisch betrachtet werden muss. Daher war es wichtig *R. rutilus* zum einen mit verschiedenen in vitro und in vivo Methoden zu untersuchen, die nach kurzer Zeit Ergebnisse zeigen (z.B. RARA, Enzymassay, RT-PCR), als auch längerfristige in vivo Expositionen vorzunehmen mit verschiedenen Endpunktbestimmungen (z.B. Mortalität, Geschlechterverhältnis, Gonadenhistologie, RT-PCR).

Da, wie oben erwähnt, das Hormonsystem auf diversen Ebenen gestört werden kann, war es erforderlich auch Untersuchungen auf diesen verschiedenen Ebenen durchzuführen. Daher sollten die Expression von FSH und LH sowie der ARO im Gehirn und den Gonaden der exponierten Tiere bestimmt werden. Als weitere Biomarker sollten die Expression von AR und ER in der Leber und den Gonaden der Fische bestimmt werden. Für diese Untersuchungen sollten im Rahmen der vorliegenden Arbeit die notwendigen Versuchsprotokolle für die RT-PCR zum semiquantitativen Nachweis der Genexpression von FSH und LH erstmalig etabliert und validiert werden. Ebenso sollten in Kooperation mit der Universität Bonn bestimmte Enzymaktivitäten analysiert werden, um einen Effekt durch AACs nachweisen zu können (z.B. Aromatase und 17 $\beta$ -Hydroxysteroid-Dehydrogenaseaktivität (17 $\beta$ -HSD)) und die Sexualsteroidbestimmung im Blutplasma bestimmt werden (E2 und 11-KT). Da während der Ontogenese Hormone eine größere Bedeutung haben und das Hormonsystem höchstwahrscheinlich nachhaltiger beeinflussbar ist als in einem ausgewachsenen Tier, wurden zum Nachweis dieser Hypothese Versuche sowohl bei larvalen Fischen als auch bei adulten Fischen durchgeführt. Ziel war es hierbei die Wirkungen von AACs auf *R. rutilus* möglichst differenziert und auf verschiedenen Wegen zu bestimmen.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Charakterisierung der Bindung von (anti)androgenen Substanzen (AACs) an Androgenrezeptoren mittels Radio-rezeptorassay (RARA)

Die Methode des RARA dient dazu die biologische Bindungsaktivitaet verschiedener Hormonrezeptoren mittels radioaktiver markierter Hormone quantitativ zu bestimmen, ohne dass die Markierung die Bindung beeinflusst. Die radioaktive Markierung ermoeeglicht die rezeptorgebundenen Liganden zu charakterisieren. Diese quantitative Bestimmung gibt Auskunft ueber das Bindungsverhalten der Rezeptoren gegenueber bestimmten Liganden. Um eine Aussage ueber den zeitlichen Verlauf treffen zu koennen, in dem die Liganden an die Rezeptoren binden, wurden kinetische Experimente durchgefuehrt.

#### 2.1.1 Kinetische Experimente

Der zeitliche Verlauf der Ligandenbindung an die Rezeptoren wurde untersucht, indem eine konstante Menge an Hormonrezeptoren mit einer definierten Menge an radioaktiv markierten Liganden ueber verschieden lange Zeitraeume inkubiert wurde. Die spezifisch gebundene Ligandenmenge (SB „specific binding“) wurde aus der Differenz zwischen der Gesamtbindung (TB „total binding“) und der unspezifischen Bindung (NB „nonspecific binding“) errechnet. Bei der TB wurde nur mit radioaktiven Liganden inkubiert, waehrend bei der NB zusaetzlich ein Ueberschuss an unmarkierten Liganden zugegeben wurde. Der Zeitpunkt, an dem sich ein stabiles Gleichgewicht („steady state“) der Ligandenbindung an den Rezeptoren einstellte, also ein Gleichgewicht von Assoziation und Dissoziation, konnte danach anhand der Bindungskurve abgelesen werden.

#### 2.1.2 Konkurrenzexperimente

Um Wechselwirkungen der Rezeptoren mit exogenen Substanzen aufzeigen zu koennen, nutzt man indirekt die Bindung des Radioliganden an die Rezeptoren, indem man im Experiment Rezeptoren und den Radioliganden in fest definierten Konzentrationen und parallel hierzu die Kompetitoren in steigenden Konzentrationen inkubiert. Die fuer jede Konzentration der Kompetitoren gemessene Bindung des Radioliganden wurde in Prozent der spezifischen Bindung des Ausgangswertes ohne Kompetitor (Basis = 100%) in Konkurrenzkurven dargestellt. Mittels dieser Konkurrenzkurven konnte der  $IC_{50}$ -Wert („inhibiting concentration 50 percent“) errechnet werden. Hierbei handelt es sich um den Wert, bei dem 50 % des spezifisch gebundenen Radioliganden durch den unmarkierten Kompetitor ersetzt wird. Die Berechnung der  $IC_{50}$ -Werte erfolgt ueber die Formel:  $\logit(P) = \ln(P/(1-P))$ . Hierzu wurde die Konkurrenzkurve durch eine logit-log-Transformation linearisiert. Somit entspricht P dem prozentualen Anteil der spezifischen Bindung des Ausgangswertes (Basis = 1). Die graphische Darstellung erfolgt in einem logit-log-Plot, wodurch der  $IC_{50}$ -Wert bei  $\logit = 0$  ( $P = 0,5$ ) mittels einer linearen Regressionsanalyse bestimmt werden kann.

### 2.1.3 Arbeitsloesungen und Chemikalien

#### **Tris-HCl-Pufferloesung:**

20 mM Tris-HCl (Boehringer; Ingelheim)

250 mM Saccharose (Merck; Darmstadt)

10 mM Na<sub>2</sub>-Molybdat (Merck; Darmstadt)

5 mM Dithiothreitol (Boehringer; Ingelheim)

Die Pufferloesung wurde unmittelbar vor jedem Versuchsansatz neu angesetzt.

#### **Aktivkohlesuspension:**

20 mM Tris-HCl-Pufferloesung

3,75 % Aktivkohle Norit A (Boehringer; Ingelheim)

0,375 % Dextran T70 (Roth, Karlsruhe)

Die Suspension wurde mehrere Stunden geruehrt und bei 8°C gelagert. Vor dem Gebrauch wurde erneut 15 min geruehrt.

#### **Hormonloesung:**

[<sup>3</sup>H]-T 96 Ci/mmol in Ethanol (Amersham; Braunschweig)

Das radioaktive Hormon wurde unter Stickstoffbegasung entnommen und in 5% Ethanol aufgenommen.

#### **Unmarkierte endogene Liganden:**

Testosteron (T) (Sigma; Deisenhofen)

17-β-Oestradiol (E2) (Sigma; Deisenhofen)

#### **Unmarkierte exogene Liganden:**

Triphenylzinn (TPT)

Cyproteronacetat (CYP)

4, 4'-Dichlordiphenyldichlorethylen (p, p'-DDE)

17-β-Oestradiol (E2)

Methyltestosteron (MT)

Testosteron (T)

Alle aufgefuehrten exogenen Liganden wurden von Sigma-Aldrich, Steinheim, bezogen.

### 2.1.4 Gewebeentnahme und Verarbeitung

Die Tiere wurden mit einem Schlag auf dem Kopf betäubt und das Rückenmark durchtrennt. Ventral wurde die Bauchhöhle eröffnet und die Leber sowie die Gonaden entnommen. Sowohl die Leber als auch die Gonaden wurden direkt in eine eiskalte Tris-HCl-Pufferlösung überführt und gewogen. Die Gewebe wurden zerkleinert und zweimal in Pufferlösung gewaschen, um das Blut zu entfernen. Danach wurden die Proben in Tris-HCl-Pufferlösung (3 ml/g Gewebe) aufgenommen und anschließend mit einem Teflon Pistill (Braun, Melsungen) in einem Glaspottergefäß zwanzigmal bei 1000 U/min homogenisiert.

Das Homogenat wurde zweimal zentrifugiert:

1. Schritt: 12000 g fuer 10 min bei 4°C
2. Schritt: 100000 g fuer 60 min bei 4°C (L-90K Ultrazentrifuge, Beckmann)

Mit einer Pasteurpipette wurde das Homogenat in eisgekühlte Erlenmeierkolben überführt und das Pellet sowie die Lipidschicht verworfen. Zur Bestimmung der spezifisch gebundenen Ligandenmenge wurden Inkubationsansätze fuer TB und NB nach folgendem Schema pipettiert:

**Gesamtbindung:**

150 µl Puffer

10 µl Ethanol 96%

100 µl Homogenat

25 µl [<sup>3</sup>H]-T

**Unspezifische Bindung:**

150 µl Puffer

10 µl unmarkiertes Hormon in Ethanol 96%

(1000-facher Ueberschuss)

100 µl Homogenat

25 µl [<sup>3</sup>H]-T

Bei den Kompetitionsexperimenten wurden anstelle des unmarkierten natuerlichen Liganden die entsprechenden Mengen (s. 2.1.6) an unmarkierten Kompetitoren zugegeben. Die Inkubationsansätze zur Bestimmung der Hormonrezeptorbindung erfolgten bei 4°C.

### 2.1.5 Trennung von rezeptorgebundenen und freiem Hormon

Nach 24 h Inkubation wurden die nicht gebundenen Hormone von den rezeptorgebundenen Hormonen durch Zugabe von 300 µl Aktivkohlesuspension abgetrennt. Die freien Hormone wurden hierbei durch die Aktivkohle absorbiert. Nach weiteren 5 min Inkubation wurden die Proben fuer 15 min bei 3750 g zentrifugiert und 300 µl

Ueberstand, in dem sich das rezeptorgebundene Hormon befindet, in einen Szintillationscocktail (Packard Instrument B.V; Groningen; Niederlande) pipettiert. Die Messung der Radioaktivitaet erfolgte in einem Fluessigkeits-Szintillationszaehler (Liquid Scintillation Counter LSC, Tri Carb 3000; Packard Instrument B.V; Groningen; Niederlande).

### 2.1.6 Kinetische Experimente am Androgenrezeptor

In Lebern und Gonaden von maennlichen und weiblichen Ploetzen wurde der Assoziationsverlauf der [ $^3\text{H}$ ]-Testosteronbindung an Androgenrezeptoren zur Ermittlung der optimalen Inkubationszeit bestimmt. Alle Experimente wurden mit einer Doppelbestimmung pro Ansatz durchgefuehrt. Die Inkubation fuer TB und NB erfolgte bei den Weibchen mit  $0,38$  bzw.  $1,63 \cdot 10^{-8}$  M [ $^3\text{H}$ ]-T, bei den Maennchen mit  $0,5$  bzw.  $2,0 \cdot 10^{-8}$  M [ $^3\text{H}$ ]-T fuer 1, 2, 3, 5, 7, 10, 20 und 24 Stunden. Die Konzentration des unmarkierten T betrug bei der NB  $10^{-5}$  M. Die Kompetitionsexperimente wurden mit sieben Maennchen und sieben Weibchen von *R. rutilus* durchgefuehrt. Die Inkubationszeit von 24 Stunden ergab sich aus den Assoziationsexperimenten, die ueber diesen Zeitraum ein „steady state“ der Bindung erkennen ließen. Die Konzentration von [ $^3\text{H}$ ]-T wurde bei allen Experimenten konstant eingehalten ( $1,5 \cdot 10^{-8}$  M). Anschließend wurde das Experiment mit Aktivkohlesuspension abgestoppt und der Radioligand in Abhaengigkeit zu den steigenden Konzentrationen der Kompetitoren gemessen. Als endogene Liganden wurden T und E2 in Konzentrationen von  $10^{-8}$  M bis  $10^{-4}$  M eingesetzt. MT als artifizielles Hormon, CYP, Tamoxifen (TAM) und Bisphenol A (BPA) als exogene Liganden wurden ebenfalls in einer Konzentration von  $10^{-8}$  M bis  $10^{-4}$  M eingesetzt. In einem Konzentrationsbereich von  $10^{-5}$  M bis  $10^{-3}$  M wurden die beiden Substanzen TPT und p,p'-DDE verwendet. Die Auswertung zur Bestimmung der individuellen  $\text{IC}_{50}$ -Werte erfolgte durch die Umformung in den logit-log-Plot.

## 2.2 Tiere, Haelterung und Versuchsdurchfuehrungen der in vivo Expositionen mit larvalen *R. rutilus*

### 2.2.1 Mortalitaet

Die Anzahl der *R. rutilus* ( $n = 30$ / Becken) zu Beginn der Expositionen 1 und 2 (EX1 und EX2) wurden 100 % gesetzt. Waehrend der 210-taegigen Expositionszeit wurde die Anzahl der toten Fische dokumentiert. Nach Beendigung wurden die prozentualen Mortalitaeten fuer jede einzelne Behandlungsgruppe errechnet.

### 2.2.2 In vivo Exposition 1 (EX1) und Exposition 2 (EX2) mit larvalen *R. rutilus*

Fuer die in vivo EX1 und EX2 wurden im Fruehjahr geschlechtsreife, adulte Rotaugen (*R. rutilus*) aus dem Mueggelsee in Berlin, Deutschland gefangen und bis zum Laichen in 200 L Becken gehaeltert. Unmittelbar nach dem Laichen wurden die Eier gesammelt und nach dem Zufallsverfahren auf 28 Becken mit 10 L Volumen verteilt. Um die Osmolaritaet von Trinkwasser zu erreichen wurden zu 10 L Aqua dest. 2,5 g marines Salz (Tagis Tropical Marine, Dreieich) hinzugegeben. Die antizyklisch angeordneten Becken wurden durch Sprudelsteine belueftet und bei einer Temperatur von  $20 \pm 1^\circ\text{C}$  gehalten. Waehrend der folgenden 210 Tage wurde dreimal in der Woche die Haelfte des Behandlungsmediums gewechselt. Die Tiere wurden 2-3-mal taeglich mit *Artemia*



*salina* ad libitum gefuettert. Nach der Expositionszeit wurden die Tiere durch einen Genickschnitt getoetet und die Totallaenge der Fische gemessen. Dies ist die Distanz zwischen der Kopfspitze und dem Hinterende der natuerlich ausgebreiteten Schwanzflosse. Die Ablesegenauigkeit betrug  $\pm 1$  mm. Anschließend wurde das Gewicht der *R. rutilus* mit einer Feinwaage (Sartorius Werk, Goettingen) bestimmt. Die Genauigkeit der Messung betrug  $\pm 0,001$  g.

Jedem Fisch wurden Gehirn, Leber und Gonaden entnommen und in Reaktionsgefäße gegeben, die sofort in fluessigen Stickstoff ueberfuehrt wurden. Anschließend wurden die Proben bis zur weiteren Bearbeitung bei minus 80°C aufbewahrt. Beim EX1 wurden je 30 Eier pro Becken eingesetzt und nach einem Tag wurden die Substanzen hinzugegeben. Die Behandlungen waren: 2 \* Loesungsmittelkontrolle (Soco); TPT 2 \* ( $10^{-8}$ ,  $0,5 \cdot 10^{-8}$ ,  $10^{-9}$ ,  $0,5 \cdot 10^{-9}$  [M]); Vinclozolin (VIN) 2 \* ( $10^{-8}$ ,  $0,5 \cdot 10^{-8}$ ,  $10^{-9}$ ) 1 \* ( $0,5 \cdot 10^{-9}$ ) [M] und Fenarimol (FEN) 2 \* ( $10^{-8}$ ,  $0,5 \cdot 10^{-8}$ ,  $10^{-9}$ ) 1 \* ( $0,5 \cdot 10^{-9}$ ) [M]. In EX2 wurden ebenfalls je 30 Eier pro Becken eingesetzt. Die Behandlungen waren: 2 \* Soco; MT 2 \* ( $10^{-8}$ ,  $0,5 \cdot 10^{-8}$ ,  $10^{-9}$ ,  $0,5 \cdot 10^{-9}$  [M]); CYP 2 \* ( $10^{-8}$ ,  $0,5 \cdot 10^{-8}$ ,  $10^{-9}$ ,  $0,5 \cdot 10^{-9}$  [M]) und Letrozol (LET) 2 \* ( $10^{-8}$ ,  $0,5 \cdot 10^{-8}$ ,  $10^{-9}$ ,  $0,5 \cdot 10^{-9}$  [M]).

### 2.2.3 Geschlechterbestimmung

Nach dem Wiegen der Fische wurde ventral von der Kloake bis zur Kiemenkonjugation mit einem Sagitalschnitt der Bauchraum eroeffnet und nach dem Entnehmen von Leber und Darm, das Geschlecht anhand der Gonaden morphologisch bestimmt. Zur Ueberpruefung der morphologischen Geschlechtsbestimmung sowie zur Bestimmung von Veraenderungen auf zellulaerer Ebene wurde ein Teil der Gonaden histologisch untersucht.

### 2.2.4 Bestimmung der Genexpression in Geweben larvaler *R. rutilus* mittels der Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

Die RT-PCR ist eine Methode mit deren Hilfe extrem geringe Mengen an mRNA spezifisch detektiert werden koennen, indem die mRNA durch die reverse Transkription in eine komplementaere DNA (cDNA) umgeschrieben wird. Diese cDNA wird dann in einer „Polymerase-Chain-Reaction“ (PCR) durch Einsatz spezifischer Primer und des Enzyms Taq-Polymerase amplifiziert. Die Methode der RT-PCR ist eine weitaus sensitivere Methode als die bisherigen RNA-Blot-Techniken (Byrne et al., 1988; Wang et al., 1989). Die Gesamt-RNA, die auch die mRNA enthaelt, wird aus den Zellen phenolisch extrahiert. Die RT-PCR beginnt mit der cDNA-Erststrangsynthese. Mit Hilfe der „Avian Myeloblastosis Virus-Reverse Transcriptase“ (AMV-RT), einer RNA abhaengigen DNA-Polymerase, kann die cDNA synthetisiert werden. Eine einzelstraengige RNA dient der AMV-RT als Matrize und wird in Anwesenheit eines Primer in 5'  $\rightarrow$  3'Richtung synthetisiert. Die resultierende cDNA wird zur PCR eingesetzt, welche es ermoeeglicht, gezielt diese DNA-Abschnitte zu vervielfaeltigen. Durch zyklische Wiederholung der einzelnen PCR-Schritte kann die geringe Ausgangsmenge der cDNA amplifiziert werden. Mittels der PCR wurde in dieser Untersuchung eine spezifische Amplifikation verschiedener cDNA durchgefuehrt. Als interner Standard fuer die semiquantitative Bestimmung der mRNAs, wurde die mRNA des Elongationsfaktor 1 $\alpha$  (EF) als „house-keeping gene“ (Dostal et al., 1994) aus der jeweiligen gleichen Probe mitbestimmt. Die PCR-Produkte wurden in einem ethidiumbromidhaltigen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Anschließend wurde unter UV-Licht mittels Fluoreszenzmessung die Intensitaet der Banden bestimmt.

Die Ergebnisse der densitometrischen Auswertung fuer die cDNA wurden mit Hilfe der EF-Werte im Bezug auf etwaige Artefakte normalisiert.

#### 2.2.4.1 Phenolische Extraktion der RNA

##### **Chemikalien:**

Trizol-RNA-Isolationsmedium (Gibco BRL, Eggenstein)

Chloroform (Roth, Karlsruhe)

Isopropanol (Roth, Karlsruhe)

Ethanol 70% (Merck, Darmstadt)

DEPC (Diethylpyrocarbonat) behandeltes Wasser (0,01%; 100 µl/l), autoklaviert. (Roth, Karlsruhe)

##### **RNA-Extraktion aus den Geweben:**

Die Proben in einem 2 ml Eppendorfgefäße wurden kurz angetaut und 700 µl Trizol hinzugegeben und mit einem Ultra-Turrax (IKA Labortechnik, Staufen) homogenisiert. Nach einer 5-minuetigen Inkubationszeit (Membranen und sonstige Kompartimente wurden geloest) wurden 160 µl Chloroform zur Trennung der lipophilen von der hydrophilen Phase hinzugegeben. Dieses Gemisch wurde 15 s gemixt und erneut fuer 3 min bei Raumtemperatur inkubiert. Zur vollstaendigen Trennung der beiden Phasen wurden die Eppendorfgefäße 15 min lang zentrifugiert (4°C; 12000 rpm). Von dem Gesamt-RNA enthaltenen Ueberstand wurden 200 µl abgenommen und in sterile Eppendorfgefäße (1,5 ml) ueberfuehrt. Unmittelbar nach der darauf folgenden Zugabe von 300 µl Isopropanol wurden die Gefäße kurz geschuettelt und bei Raumtemperatur 10 min inkubiert (Faellung der RNA).

Der Ueberstand, der sich nach einer weiteren 10-minuetigen Zentrifugation (Heraeus Inc., Hanau) (4°C; 12000 rpm) ergab, wurde entnommen und verworfen. Um das im Eppendorfgefäße verbliebene RNA-Pellet zu waschen, wurden 300 µl Ethanol (70% p.a.) hinzugegeben. Dieses Gemisch wurde erneut zentrifugiert (5 min; 4°C und 12000 rpm) und anschließend der Ueberstand verworfen. Das RNA-Pellet wurde bei 37°C getrocknet und stand nun allen weiteren Arbeitsschritten, die auf Eis durchgefuehrt wurden, zur Verfuegung.

#### 2.2.4.2 Bestimmung der Menge und der Reinheit der RNA

Zunaechst wurde das Pellet in 20 µl DEPC-Wasser aufgenommen und vorsichtig resuspendiert. Von der resuspendierten RNA-Loesung wurden 2 µl zusammen mit 198 µl DEPC-Wasser in 96-Well-Platten (Greiner, Frickenhausen) pipettiert und in einen Plattenreader (Spectrafluor; Tecan, Crailsheim) gegeben, um die Menge der RNA zu bestimmen. Die Auswertung erfolgte ueber das Computerprogramm Magellan (Tecan, Crailsheim), welches die Absorption bei Wellenlaengen von 260 nm und 280 nm ermittelt. Der bei 260 nm gemessene Extinktionswert wurde mit dem Faktor 4 multipliziert und ergab den RNAGehalt in µg/µl. Die Reinheit der RNA wird durch den Quotienten der Extinktionswerte bei 260/280 nm charakterisiert.

### 2.2.4.3 Erststrang cDNA-Synthese durch Reverse-Transcriptase (RT)

Die Gesamt-RNA-Loesung wurde auf 1 µg/8 µl verduennt.

#### **Chemikalien:**

Wasser (Aqua bidest., autoklaviert)

Poly-(dT)-Primer (Intron, Kaltenbrunn;CH)

dNTP-Loesung (Biometra, Goettingen)

AMV-RT (Biometra, Goettingen)

AMV-RT-Puffer (10x) (Biometra, Goettingen)

8 µl der Gesamt-RNA wurden in einem 200 µl Mikrogefaß vorgelegt und 9 µl Wasser und 3 µl Primer hinzugegeben. Nach dem Mixen und Abzentrifugieren wurden diese Gefaße in einen Cycler (Thermocycler, Biometra, Goettingen) positioniert und fuer 3 min bei 70°C inkubiert. Unter diesen Bedingungen lagert sich der Poly-(dT)-Primer spezifisch an den Poly-(A)-Schwanz der mRNA an. Anschließend wurden 5 µl Wasser, 3 µl Puffer, 1,5 µl dNTPs und 0,5 µl AMV-RT hinzugegeben, gemixt und abzentrifugiert. Die Gefaße wurden erneut in den Cycler ueberfuehrt und fuer 60 min bei 37°C inkubiert. Aufgrund der mRNA-spezifischen Primerhybridisierung wurde die mRNA in cDNA transkribiert. Die Reaktion wurde durch zweiminuetiges Erhitzen auf 94°C gestoppt. AMV-RT und mRNA werden dadurch zerstört. Durch Abkuehlung wurde erreicht, dass sich die Nukleotide komplementaer zum jeweiligen cDNA-Erststrang anlagern und somit doppelstraengige cDNA entsteht.

### 2.2.4.4 Amplifikation der cDNA mittels PCR

3 µl cDNA wurden in ein 200 µl Mikrogefaß vorgelegt. Der PCR-Premix (siehe unten) wurde in einem sterilen Eppendorfgefaß gemischt und zur cDNA-Vorlage gegeben. Alle PCRs wurden mit Taq-Polymerase und dNTPs von Qiagen durchgefuehrt.

#### **PCR-Premix fuer den Elongationsfaktor 1α (EF) pro Probe:**

18,7 µl PCR-H<sub>2</sub>O

2,5 µl Taq-Puffer (10x)

0,2 µl dNTP-Loesung

0,2 µl EF-Primer forward: Sequenz: 5' - gAC TgT gCC gTg CTg ATT g - 3'

0,2 µl EF-Primer reverse: Sequenz: 5' - ATT ACC CTC CTT gCg CTC AAT - 3'

0,2 µl Taq-Polymerase

22 µl Gesamtvolumen

**Das EF-Programm des Thermocyclers**

Beginn: 94°C 1 min

25 Zyklen à:

94°C 1 min (Denaturierung)

59°C 1 min (Annealing)

72°C 1 min (DNA-Synthese)

Abschluss: 72°C 10 min

**PCR-Premix fuer die ER-cDNA pro Probe:**

18,7 µl PCR-H<sub>2</sub>O

2,5 µl Taq-Puffer (10x)

0,2 µl dNTP-Loesung

0,2 µl ER-Primer forward: Seq: 5' - TAG GGC AGC AAG TGG AAG G - 3'

0,2 µl ER-Primer reverse: Seq: 5' - TGT CAG CGA GGG TGG TTA G - 3'

0,2 µl Taq-Polymerase

22 µl Gesamtvolumen

**Das ER-cDNA-Programm im Thermocycler:**

Beginn: 94°C 1 min

33 Zyklen à

94°C 1 min (Denaturierung)

66°C 1 min (Annealing)

72°C 1 min (DNA-Synthese)

Abschluss: 72°C 10 min

**PCR-Premix fuer die AR-cDNA pro Probe:**

18,7 µl PCR-H<sub>2</sub>O

2,5 µl Taq-Puffer (10x)

0,2 µl dNTP-Loesung

0,2 µl AR-Primer forward: Seq: 5' - CTS TgC AAA gCT gTg TCC gT - 3'

0,2 µl AR-Primer reverse: Seq: 5' - TCR TCT gRR CAg ATC Agg CAC gT - 3'

0,2 µl Taq-Polymerase

22 µl Gesamtvolumen

**Das AR-cDNA-Programm im Thermocycler:**

Beginn: 94°C 1 min

36 Zyklen à

94°C 1 min (Denaturierung)

60°C 1 min (Annealing)

72°C 1 min (DNA-Synthese)

Abschluss: 72°C 10min

**PCR-Premix fuer die LH-cDNA pro Probe:**

18,7 µl PCR-H<sub>2</sub>O

2,5 µl Taq-Puffer (10x)

0,2 µl dNTP-Loesung

0,2 µl LH-Primer forward: Seq: 5' - gCT gTg AgC CgA TTA ATg AgA Cg - 3'

0,2 µl LH-Primer reverse: Seq: 5' - CTg CAg gCT CTC gAT ggT g - 3'

0,2 µl Taq-Polymerase

22 µl Gesamtvolumen

**Das LH-cDNA-Programm im Thermocycler:**

Beginn: 94°C 1 min

33 Zyklen à

94°C 1 min (Denaturierung)

60°C 1 min (Annealing)

72°C 1 min (DNA-Synthese)

Abschluss: 72°C 10 min

**PCR-Premix fuer die FSH-cDNA pro Probe:**

18,7 µl PCR-H<sub>2</sub>O

2,5 µl Taq-Puffer (10x)

0,2 µl dNTP-Loesung

0,2 µl FSH-Primer forward: Seq: 5' - gCT ggC TgA gAA CTC CAC AgT CTg - 3'

0,2 µl FSH-Primer reverse: Seq: 5' - CAg CgC TAA TgA ggg CAg gAT - 3'

0,2 µl Taq-Polymerase

22 µl Gesamtvolumen

**Das FSH-cDNA-Programm im Thermocycler:**

Beginn: 94°C 1 min

31 Zyklen à

94°C 1 min (Denaturierung)

64°C 1 min (Annealing)

72°C 1 min (DNASynthese)

Abschluss: 72°C 10 min

**PCR-Premix fuer die ARO-cDNA pro Probe:**

18,7 µl PCR-H<sub>2</sub>O

2,5 µl Taq-Puffer (10x)

0,2 µl dNTP-Loesung

0,2 µl ARO-Primer forward: Seq: 5' - CTA CAT CCC gCT CgC CTA TCT - 3'

0,2 µl ARO-Primer reverse: Seq: 5' - CTg gCA ggC ggT TCT CAT AT - 3'

0,2 µl Taq-Polymerase

22 µl Gesamtvolumen

**Das ARO-cDNA-Programm im Thermocycler:**

Beginn: 94°C 1 min

23 Zyklen à

94°C 1 min (Denaturierung)

60°C 1 min (Annealing)

72°C 1 min (DNA-Synthese)

Abschluss: 72°C 10 min

**2.2.4.5 Darstellung der amplifizierten cDNA durch Agarose-Gelelektrophorese**

**Chemikalien:**

50 x TAE-Puffer; pH 8,5:

242,0 g Tris (Ultra Qualitaet, Roth, Karlsruhe)

90,0 ml Essigsaeure

18,6 g NaEDTA

Bromphenolblau-Probenpuffer:

10 µl gesaettigte Bromphenolblau-Loesung (Sigma, Deisenhofen)

100 µl Glyzerin (Boehringer, Ingelheim)

90 µl DEPC behandeltes Wasser

Basenpaarleiter:

20 µl; von 100 bis 1000 Basenpaaren (AGS, Heidelberg)

460 µl TAE-Puffer (1x)

Ethidiumbromid-Faerbeloesung:

9 µl Ethidiumbromid-Lsg. (Roth, Karlsruhe)

Agarosegel:

1,35 g Agarose

90 ml 1x TAE-Puffer

Durchfuehrung:

Die amplifizierte cDNA wurde als Horizontal-Gelelektrophorese bei einer Spannung von 80 mV fuer 30 min in einem ethidiumbromidhaltigen Agarose-Gel (1,5%) mit 1x TAE-Puffer aufgetrennt. Die cDNA-Menge korreliert mit der im UV-Licht hervorgerufenen Fluoreszenz, die aus der Anlagerung des Ethidiumbromids in die doppelstraeugige cDNA resultiert. Das Gel wird auf einer UV-Bank bei 254 nm ueber eine Videoapparatur (Gel Doc 2000, Bio-Rad, Hercules, CA, US) aufgenommen und durch ein Computerprogramm (Quantity one, Bio-Rad, Hercules, CA, US) densitometrisch ausgewertet.

## 2.2.5 Histologie

### 2.2.5.1 Schnitte der Gonaden nach Exposition der larvalen *R. rutilus*

Ein Teil der zur histologischen Bestimmung entnommenen Gonadenproben wurden zur Weiterbehandlung mit Bouin (Sigma-Aldrich, Steinheim) fixiert und nach zweimaliger Waschung in 80%igem Ethanol an das Limnomar-Institut in Hamburg gesendet und dort von Dr. Burkard Watermann bearbeitet. Ein weiterer Teil der gonadalen Proben wurde nach gleicher Behandlung am IGB weiterbearbeitet. Sie wurden in Paraffin eingebettet, am Mikrotom geschnitten und mit Haematoxylin-Eosin gefaerbt (HE-Faerbung). Daraufhin wurden die histologischen Schnitte unter einem Lichtmikroskop angesehen und das Geschlecht morphologisch bestimmt.

### 2.2.5.2 Schnitte der Gonaden nach Exposition der juvenilen *R. rutilus*

Die Geschlechter der juvenilen Fische wurden nach der Beprobung anhand der Gonaden morphologisch bestimmt. Anschließend wurden die Gonaden zur weiteren Bestimmung sofort in Bouin ueberfuehrt und nach zweimaliger Waschung mit 80%igem Ethanol in Paraffin eingebettet, geschnitten und mit HE gefaerbt. Die Schnitte wurden anschließend lichtmikroskopisch analysiert.

## 2.3 Tiere, Haelterung und Versuchsdurchfuehrung der in vivo Exposition (EX3) mit adulten *R. rutilus*

### 2.3.1 Mortalitaet

Die Mortalitaet der vierzehntaegigen EX3 wurde wie bei EX1 und EX2 bestimmt.



### 2.3.2 In vivo Exposition 3 (EX3) mit adulten *R. rutilus*

Die adulten *R. rutilus* (2+) wurden in einer Kreislaufanlage bei 17-20°C am IGB in Berlin aufgezogen. Die ersten drei Monate wurden die Tiere zweimal taeglich mit *Artemia salina* ad libitum gefuettert. Die restlichen 21 Monate wurden sie mit Trockenfutter gefuettert, wobei die Menge ca. 10 % des Koerpergewichts entsprach. Der Versuchsaufbau beinhaltete, dass je 15 dieser Tiere in ein 30 L-Aquarium ueberfuehrt wurden. Um die Osmolaritaet von Trinkwasser zu erreichen wurden zu 30 L Aqua dest. 7,5 g marines Salz gegeben. Nach einem Tag wurden folgende Expositionsregime aufgebaut: TPT, VIN, CYP und MT wurden in einer nominalen Konzentration von  $10^{-8}$  M zugegeben. Zum Vergleich wurde eine SoCo mitgefuehrt. Die Becken wurden antizyklisch in Wasser-rinnen aufgestellt. Die Wassertemperatur in den Becken wurde auf  $20 \pm 1^\circ\text{C}$  eingestellt. Nach 14 Tagen wurden 20-40  $\mu\text{l}$  Blut aus der Caudalvene eines jeden Tieres entnommen und sofort in fluessigen Stickstoff ueberfuehrt. Wie schon bei den larvalen Expositionen (EX1 und EX2) wurden auch die adulten Tiere nach dem Versuch gemessen, gewogen und anschließend Gehirne, Leber und Gonaden entnommen und zur weiteren Behandlung bei minus 80°C gelagert.

### 2.3.3 Bestimmung der Genexpression in Geweben adulter *R. rutilus* mittels der Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

Die mRNA- und PCR-Protokolle sowie die entsprechenden Primer sind wie unter 2.2.4 aufgefuehrt verwendet worden.

### 2.3.4 Enzymassay

#### 2.3.4.1 Gewebepreparationen

Gonaden- und Gehirnproben der exponierten 2+ Ploetzen (*R. rutilus*) wurden nach der Exposition in der SoCo, in TPT, VIN, LET und MT mit einer Konzentration von jeweils  $10^{-8}$  M entnommen und unmittelbar in fluessigen Stickstoff eingefroren. Die Aufarbeitung der Proben erfolgte wie bei Steckelbroeck (Steckelbroeck et al., 1999) beschrieben. Die Proben wurden gewogen, in einen Glasmoerser mit Homogenatpuffer ueberfuehrt und mit einem Glaspistill homogenisiert. Anschließend wurden die Proben in Plastikgefäße pipettiert und in einem Ultraschallbad bei 50 Watt behandelt. Das Homogenat wurde bei 4°C und 4000 rpm fuer 15 min zentrifugiert, der Ueberstand abgenommen und in Aliquots aufgeteilt, welche erneut in fluessigen Stickstoff gefroren wurden. Die anschließende Proteinbestimmung erfolgte nach der Methode von Lowry (Lowry et al., 1951).

#### 2.3.4.2 Steroide und Chemikalien

##### Markiertes Steroid:

[1 $\beta$ - $^3\text{H}$ ] Androstenedion (25.9 Ci/mmol, PerkinElmer, Rodgau)

(Aufgereinigt durch eine Duennschicht-Chromatographie

(thin-layer chromatography, (TLC)).

**Unmarkierte Steroide:**

Androstanedion

Androstenedion

5 $\alpha$ -Dehydrotestosteron

Androsteron

Testosteron

3 $\alpha$ -Androstanediol (Referenzsteroid)

Weitere Chemikalien:

Ethylendiamintetraacetat (EDTA)

Folin & Ciocalteu's Phenolreagenz

TRIZMA<sup>®</sup>-puffer (Tris[hydroxymethyl]aminomethan)

TRIZMA<sup>®</sup>-HCl (Tris[hydroxymethyl]aminomethanhydrochlorid)

Zitronensaure

4-Methoxybenzaldehyd

Alle oben aufgelisteten Chemikalien und Steroide wurden bei Sigma-Aldrich, Seelze, bezogen.

Szintillationscocktail, Ultima Gold (PerkinElmer, Rodgau)

Nicotinamadenin dinukleotidphosphat (Hoffmann-La Roche, Grenzach-Wyhlen)

Polygram<sup>TM</sup> Kieselgel (Macherey & Nagel, Dueren)

Homogenatpuffer zur Aufnahme der Proben

Der Puffer enthaelt 10 mM TRIZMA<sup>®</sup>-HCl und 1 mM EDTA bei einem pH Wert von 7,4.

### 2.3.4.3 Durchfuehrung

Der Enzymassay ist eine Methode zur Bestimmung der Aktivitaet bestimmter Enzyme in unterschiedlichen Geweben. In Zusammenarbeit mit der Medizinischen Fakultät der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn wurde die Aromataseaktivitaet in den Gonaden und den Gehirnen beider Geschlechter der 2+ Ploetzen nach der Methode von Steckelbroeck (Steckelbroeck, 1999) untersucht. Hierzu wurden die Aliquot (s. Gewebepreparation) in Homogenatpuffer geloest und ueber einen Zeitraum von 30 min inkubiert, so dass in einem 50  $\mu$ l Aliquot circa 10 % des Substrates waehrend der Inkubationszeit umgewandelt wurde. 100  $\mu$ l [1 $\beta$ -<sup>3</sup>H] Androstenedion-Loesung (geloest in 0,1  $\mu$ M Assay-Puffer) wurde danach zu den Proben hinzugegeben.

Durch Zugabe von 50 µl einer 3 mM NADPH-Lösung wurde die Enzymreaktion gestartet. Die verschlossenen Reaktionsgefäße wurden gemixt und für 30 min bei 37°C (ARO), bzw. bei 24 °C (5α-Reduktase) geschüttelt. Das Stoppen der Reaktion erfolgte durch Abkühlen der Reaktionsgefäße auf Eis. Die organischen Anteile wurden anschließend in eiskaltem Chloroform aufgenommen.

Zur Quantifizierung wurden 100 µl der organischen Phase unter Stickstoffbegasung durch Verdunstung getrocknet. Die getrockneten Aliquots wurden in 50 µl Chloroform gelöst, das je 100 µg der unmarkierten Steroide enthielt. Die gelösten Aliquots wurden auf eine 20x20 cm Duennschicht-Chromatographie-Platte (TLC) aufgetragen, die mit Kieselgel in einer Höhe von 0,25 mm beschichtet waren. Die Separierung wurde auf einer ein-dimensionalen TLC durch Verwendung von Dichlormethan und Azeton in einem Volumenverhältnis von 92,5:7,5 erreicht. Die Kieselgelschicht wurde getrocknet, die Referenzsteroiden durch Besprühen einer Mischung aus Essigsäure (100 ml), Schwefelsäure (2 ml) und Anisaldehyd (1 ml) angefärbt und anschließend bei 130°C wieder getrocknet. Jede Bande wurde ausgeschnitten und in ein Vial mit 15 ml Szintillations-Cocktail transferiert. Nach 48 Stunden wurde die Radioaktivität automatisch mit einem Wallac 1409 Liquid-Szintillationszähler (Wallac, Turku, Finnland) in dpm (dps) gemessen. Die relative Anzahl der korrespondierenden radioaktiven Steroide wurde prozentual zur totalen Radioaktivität (100 %) kalkuliert. Der Blindwert wurde von den gemessenen Metabolismusraten der verschiedenen Gewebe subtrahiert. Die Aktivität der Enzyme wurde in pmol/h/mg Protein dargestellt.

### 2.3.5 Bindung der Sexualsteroiden im Blut von 2+ *R. rutilus* nach in vivo Kurzzeitexposition mit AACs mittels EnzymimmunoAssay (EIA)

Der EIA ist eine Methode zur quantitativen Bestimmung kleinster Substanzmengen wie zum Beispiel Hormone in einer Probe durch Antikörper und gehört zu den kompetitiven Bindungsassays. Beim EIA handelt es sich um eine immunochemische Reaktion zwischen einem spezifischen Antikörper, dem Anti-rabbit IgG und einem Kaninchenantikörper-Hormon-Komplex. Die Oberflächen der Kavitäten einer Mikrotiterplatte sind mit diesem spezifischen Antikörper beschichtet (precoated), an den der Kaninchenantikörper-Hormon-Komplex bindet. Der Komplex besteht aus einem Antikörper an den ein enzymmarkierter Tracer (hier Acetylcholinesterase (AChE)) sowie die Hormone aus einer Probe oder Standardmoleküle zur Erstellung der Standardkurve binden. Die Menge des AChE-Tracers, die an das Anti-rabbit IgG in den Kavitäten der Mikrotiterplatte gebunden wurde, ergibt nach der Zugabe eines Substrates (Ellman's reagent) eine Reaktion, bei der ein Produkt entsteht, dessen Farbintensität photometrisch bei einer Wellenlänge von 405-420 nm detektiert werden kann. Die gemessene Intensität ist der Konzentration des zu messenden Hormons in der Probe umgekehrt proportional. Die Kalibrierung des Enzymimmunoassays wird durch eine Standardlösung des zu bestimmenden Hormons erstellt.

#### 2.3.5.1 Arbeitslösungen und Chemikalien

Lösungspuffer:

15 ml des Konzentrates gelöst in 135 ml Aqua dest.

Waschpuffer:

2 PBS-Tabletten gelöst in 200 ml Aqua dest. und Zugabe von 0,2 ml 50% Tween 20

Standardloesung:

100 µl 11-KT bzw. E2 Standard geloest in 900 µl Loesungspuffer. Ergibt eine Stammloesung von 5 ng/ml

AchE-Tracer (100x):

55 µl konzentrierter Tracer geloest in 5,45 ml Loesungspuffer

Antikoerper (50x):

110 µl konzentrierter Antikoerper geloest in 5,4 ml Loesungspuffer

### 2.3.5.2 Probenahme und Verarbeitung der Blutproben zur Hormonbestimmung

Das Blut wurde mit heparinisierten Haematokritrohrchen (Brand Micro haematocrit tubes, Roth, Karlsruhe) aus den Bulbus arteriosus entnommen und in ein 1,0 ml Reaktionsgefäß (Eppendorf, Hamburg) ueberfuehrt. Dieses wurde zur Weiterverarbeitung bei -80°C gelagert. Nach dem Auftauen wurden die Blutproben zentrifugiert und 150 µl Plasma zur Weiterbearbeitung in 1 ml 99,9% Ethanol p.a. aufgenommen. Dieses wurde gevortex und anschließend bei 2500 rpm fuer 5 min zentrifugiert (Eppendorfszentrifuge, Eppendorf, Hamburg). Der Ueberstand wurde in Glasvials ueberfuehrt und unter einem Abzug extrahiert. Anschließend wurde der Extrakt in 250 µl 99,9% Ethanol p.a. aufgenommen und fuer die Hormonbestimmung eingesetzt. Den jeweiligen Protokollen folgend wurden die Doppelbestimmungen von E2 im Serum der Ploetzen mit einem Estradiol-EIA-Kit (Cayman Chemical Company, Michigan, USA) und die des 11-KT mit einem 11-Keto-EIA-Kit (Biosense, Bornheim) durchgefuehrt. Nachdem die Proben auf Eis standen, wurde zunaechst eine Standardreihe erstellt. In ein Reaktionsgefäß (SL) wurden 900 µl und in acht weitere jeweils 500 µl des Loesungspuffers vorgelegt. In das erste Reaktionsgefäß wurden 100 µl der Standardloesung hinzugegeben, so dass eine Loesung mit einer Konzentration von 500 pg/ml des Standards hergestellt wurde. Diese Loesung wurde gemixt und 500 µl davon in das zweite Reaktionsgefäß (S1) ueberfuehrt. Das zweite Reaktionsgefäß (S1) wurde ebenfalls gemixt und 500 µl in das naechste Gefäß (S2) gegeben, welches nun 250pg/ml Standardmolekuels erhielt. Dieses Verfahren wiederholt man bis hin zum letzten Reaktionsgefäß (S8) und erhaelt so die Standardreihe.

Die extrahierten Proben wurden mit Loesungspuffer nach folgendem Schema verduennt:

1:50 Verduennung: 10 µl Plasmaprobe in 490 µl Loesungspuffer

1:100 Verduennung: 5 µl Plasmaprobe in 495 µl Loesungspuffer

1:500 Verduennung: 1 µl Plasmaprobe in 499 µl Loesungspuffer

Anschließend wurden die Proben und die Standardreihe auf eine 96-Well-Platte (Greiner, Frickenhausen) nach folgendem Arrangement belegt:

BL	S1	S5	P1 /50	P2/100	3	5	6	7	9	10	11
BL	S1	S5	P1/ 50	P2/100	3	5	6	7	9	10	11
NB	S2	S6	P1/100	P2/500	4	5	6	8	9	10	12
NB	S2	S6	P1/100	P2/500	4	5	6	8	9	10	12
B0	S3	S7	P1/500	3	4	5	7	8	9	11	12
B0	S3	S7	P1/500	3	4	5	7	8	9	11	12
TA	S4	S8	P2 /50	3	4	6	7	8	10	11	12
TA	S4	S8	P2 /50	3	4	6	7	8	10	11	12

Abkuerzungen: BL = Blank → Hintergrund Absorption des Ellman's Reagenz

NB = Nonspecific Binding → Unspezifische Bindung des 11-KT- bzw. E2-tracers

TA = Total Activity → Gesamte enzymatische Aktivitaet des Tracers

B0 = Maximum Binding → Die gesamte Menge des Tracers, der an den Antikoerper in Abwesenheit der Standards und der Proben enthaltenden Enzyme binden konnte.

S1-S8 = Standardreihe

P1/50 = Probe 1 in einer Verduennung von 1:50

In die NB-wells wurden 100 µl, in die B0-wells 50 µl des Loesungspuffers vorgelegt. Je 50 µl der jeweiligen Standards wurden in die S1 - S8 Wells pipettiert und je 50 µl der entsprechenden verdueinten Plasmaproben in die Kavitaeten P1 - P12. Anschließend wurde bei 4°C weitergearbeitet und je 50 µl des AchE-Tracers in jede Kavitaet hinzugegeben mit Ausnahme der TA- und BL-Kavitaeten. Hiernach wurde in jede Kavitaet, mit Ausnahme der TA-, Blank- und NB-Kavitaeten, 50 µl Antikoerperloesung zugefuegt. Die Platte wurde verschlossen und fuer zwei Stunden auf einem Orbitalplattenschuettler bei 400 Rotationen/min und Raumtemperatur geschuettelt. Anschließend wurden die 96-Well-Platten fuenfmal hintereinander vorsichtig mit 200 µl Waschpuffer gewaschen, der durch leichtes schlagen der umgedrehten Platte auf ein Papierhandtuch aus den Kavitaeten entfernt wurde. 200 µl Ellman's Reagenz wurde in alle Kavitaeten zugegeben. Die TA-Kavitaeten erhielten 5 µl des geloesten Tracers. Die mit Aluminiumfolie abgedeckte Platte wurde fuer eine Stunde auf dem Horizontalschuettler bei Raumtemperatur inkubiert und dann im Tecan®-Plattenreader bei einer Wellenlaenge von 405 - 420 nm photometrisch gemessen. Die Ergebnisse wurden mathematisch transformiert und in pg/mol graphisch dargestellt.

## 2.4 Statistik

Alle statistischen Analysen wurden mit dem Statistikprogramm GraphPad Prism® (San Diego, CA 92130, USA) erstellt.

### 2.4.1 Gewicht, Laenge und Geschlechterverhaeltnis der Fische

Die Ergebnisse der Messungen wurden mit dem Kolmogorov-Smirnov-Test (KS) auf ihre Normalverteilung getestet. Signifikante Unterschiede zwischen der SoCo und den Behandlungsgruppen wurden bei normalverteil-

ten Daten mit der one-way analysis of variance (ANOVA) gefolgt von Dunnetts-Test geprüfert. Bei nicht normalverteilten Daten wurden die Messungen mit dem nicht parametrischen Dunns-Test auf signifikante Unterschiede zur SoCo getestet.

### **2.4.2 Genexpression mittels RT-PCR**

Die densitometrische Werte der PCR-Produkte der ausgewählten Gene wurden zur statistischen Analyse verwendet und durch die densitometrischen Werte der PCR-Produkte des EF-1 $\alpha$  normalisiert. Effekte der behandelten Gruppen im Vergleich zur SoCo wurden nach Geschlechtern getrennt geprüfert. Mit ANOVA wurden signifikante Unterschiede zur SoCo getestet und mit dem Dunnetts-Test geprüfert. Beim Auftreten von Varianzen der Ergebnisse wurden die Messungen mit dem nicht parametrischen Dunns-Test auf signifikante Unterschiede zur SoCo getestet.

### **2.4.3 Enzymbestimmungen und Sexualsteroidspiegel im Blut**

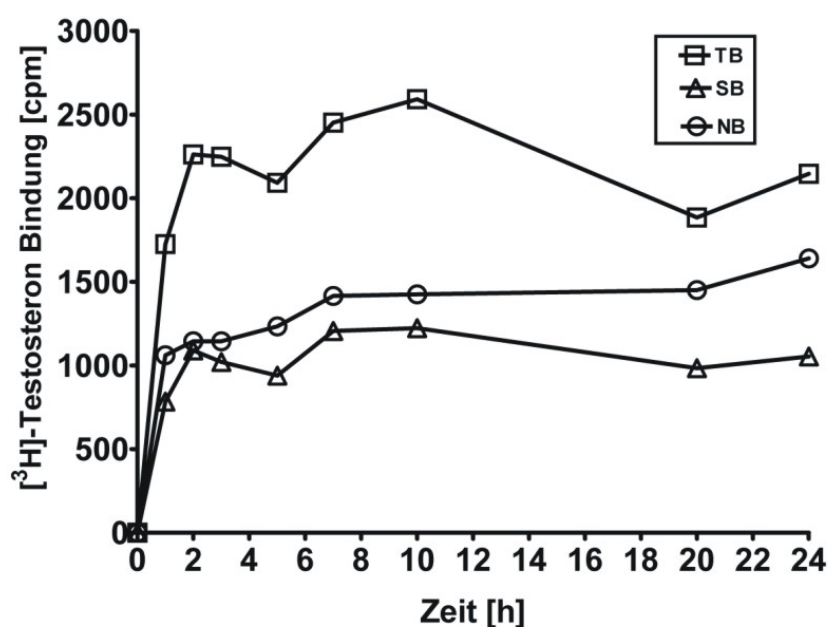
Nach Geschlechtern getrennt wurden signifikante Unterschiede der Ergebnisse der mit AACs exponierten Tiere zur SoCo analysiert. Nach der Untersuchung auf Normalverteilung und Anwendung des ANOVA zur Analyse der Varianz wurde der Dunnetts-Test durchgeführt.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Charakterisierung der Bindung der (anti)androgenen Substanzen (AAC`s) an Androgenrezeptoren mittels Radio-rezeptorassay

##### 3.1.1 Kinetische Experimente

Zur Bestimmung des zeitlichen Verlaufs der Bindung von [ $^3\text{H}$ ]-T an die Androgenrezeptoren in Leber- bzw. Gonadengewebe wurden Versuche an weiblichen und männlichen Ploetzchen durchgeführt. Die Ergebnisse zeigten, dass die spezifische Bindung bei beiden Geschlechtern in den ersten beiden Stunden stark ansteigt und sich nach drei Stunden ein Gleichgewicht zwischen Assoziation und Dissoziation einstellt. Um eine Unabhängigkeit der zeitlichen Bindung von den eingesetzten Konzentrationen des [ $^3\text{H}$ ]-T zu zeigen, wurden die kinetischen Experimente mit jeweils einer hohen und einer niedrigen Konzentration bei 4°C durchgeführt. Weder wiesen die jeweils eingesetzten Konzentrationen (Abb. 3.1 und 3.2) noch die verschiedenen Geschlechter (Abb. 3.3 und 3.4) Unterschiede im zeitlichen Verlauf der Bindung auf. Dies galt auch für den Vergleich von Lebergewebe mit Gonadengewebe (Abb. 3.5 und 3.6). Die aus den Differenzen zwischen Totalbindung (TB) und nichtspezifischer Bindung (NB) resultierende spezifische Bindung (SB) unterschieden sich nur hinsichtlich ihrer Menge.



**Abb. 3.1:** Zeitlicher Verlauf der Bindung von [ $^3\text{H}$ ]-T an die Androgenrezeptoren aus dem Gonadocytosol eines 2+ Ploetzchenweibchens bei 4°C. Die eingesetzte Konzentration des [ $^3\text{H}$ ]-T beträgt 3,8 nM. Das unmarkierte T zur Bestimmung der unspezifischen Bindung wurde im Versuchsansatz im 1000-fachen Überschuss ( $10^{-5}$  M) hinzugegeben. TB = Gesamtbindung, NB = unspezifische Bindung und SB = spezifische Bindung (Differenz TB - NB).

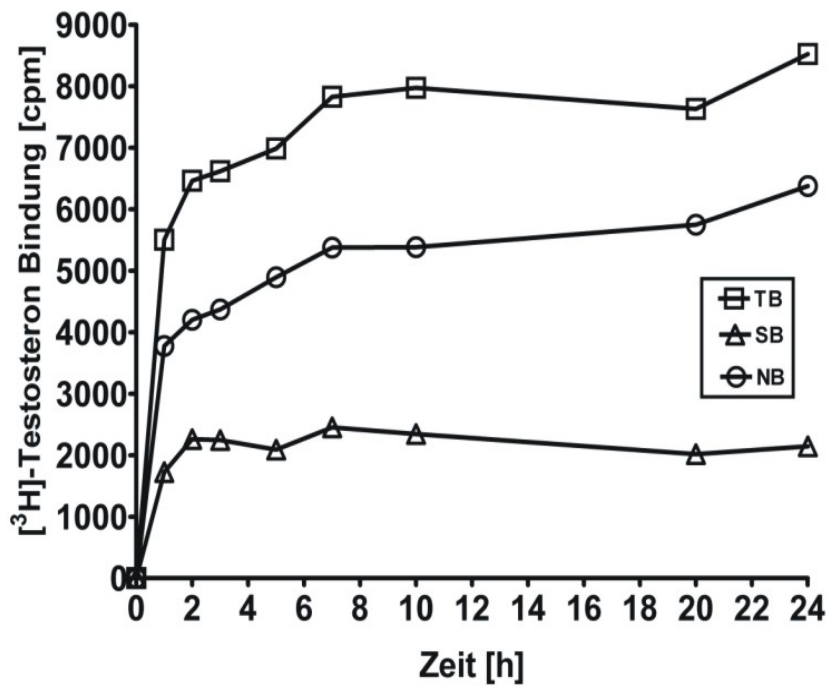


Abb. 3.2: Zeitlicher Verlauf der Bindung von  $[^3\text{H}]\text{-T}$  an die Androgenrezeptoren aus dem Gonadocytosol eines 2+ Plötzenweibchens bei 4°C. Die eingesetzte Konzentration des  $[^3\text{H}]\text{-T}$  beträgt 16,3 nM.

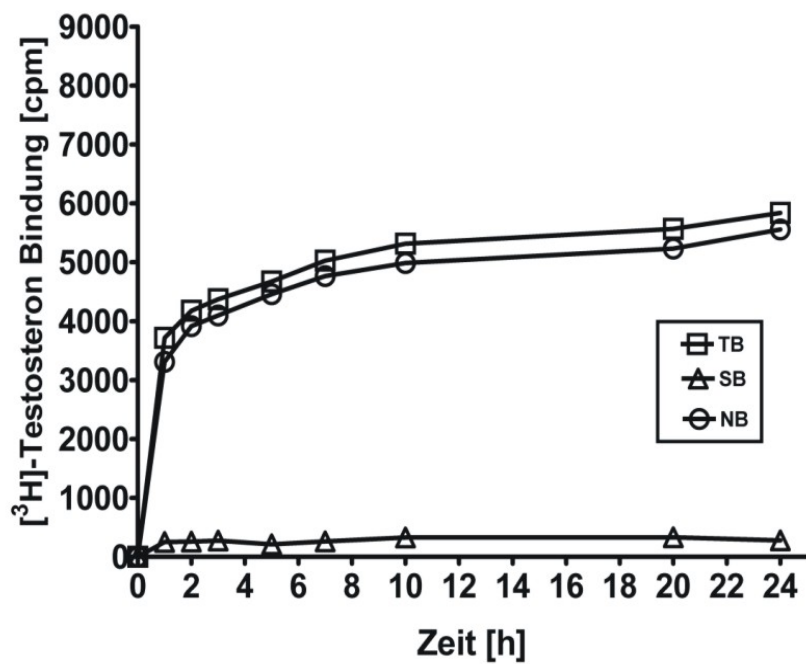


Abb. 3.3: Zeitlicher Verlauf der Bindung von  $[^3\text{H}]\text{-T}$  an die Androgenrezeptoren aus dem Lebercytosol eines 2+ Plötzenweibchens bei 4°C. Die eingesetzte Konzentration des  $[^3\text{H}]\text{-T}$  beträgt 16,3 nM.



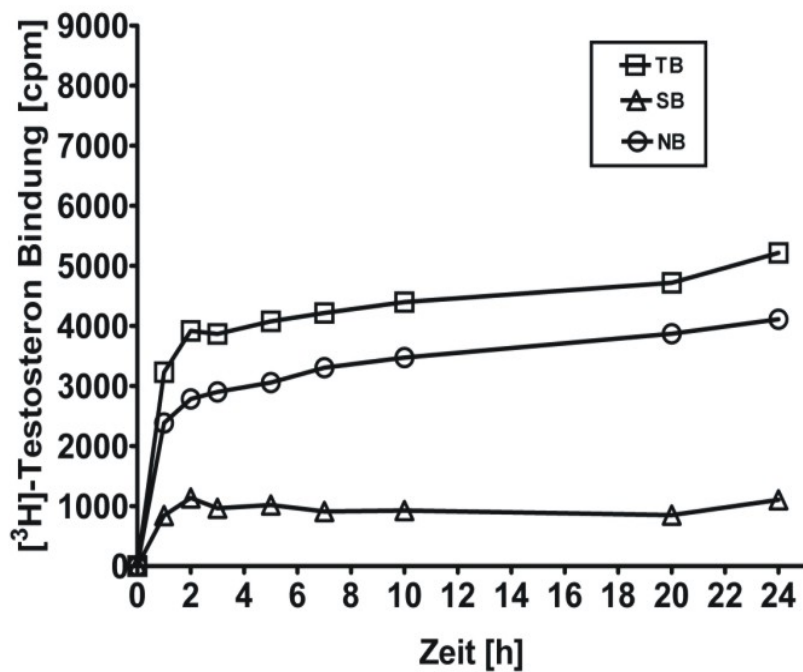


Abb. 3.4: Zeitlicher Verlauf der Bindung von  $[^3\text{H}]$ -T an die Androgenrezeptoren aus dem Lebercytosol eines 2+ Plötzenmännchens bei 4°C. Die eingesetzte Konzentration des  $[^3\text{H}]$ -T beträgt 20,0 nM.

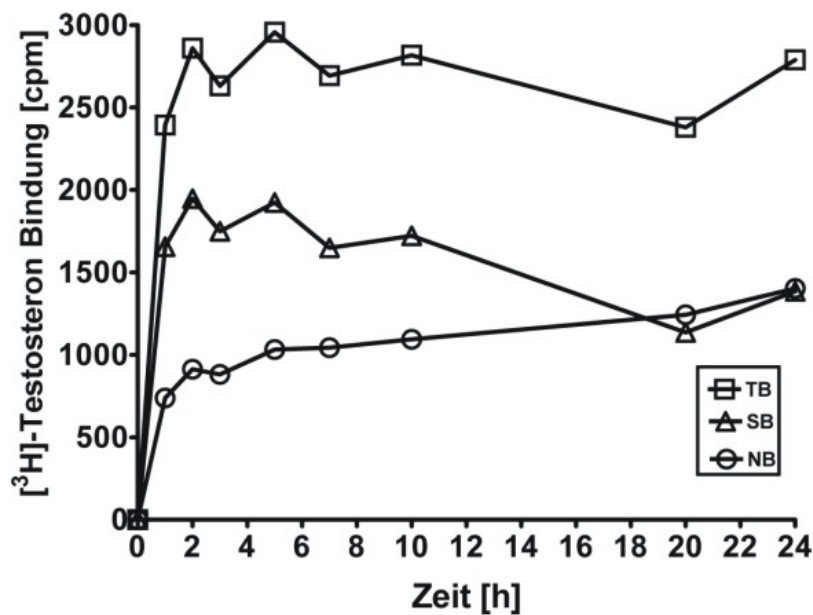


Abb. 3.5: Zeitlicher Verlauf der Bindung von  $[^3\text{H}]$ -T an die Androgenrezeptoren aus dem Gonadocytyosol eines 2+ Plötzenmännchens bei 4°C. Die eingesetzte Konzentration des  $[^3\text{H}]$ -T beträgt 5,0 nM. Das unmarkierte T zur Bestimmung der unspezifischen Bindung wurde im Versuchsansatz im 1000-fachen Überschuß ( $10^{-5}$  M) hinzugegeben. TB = Gesamtbindung, NB = unspezifische Bindung und SB = spezifische Bindung (Differenz TB - NB).

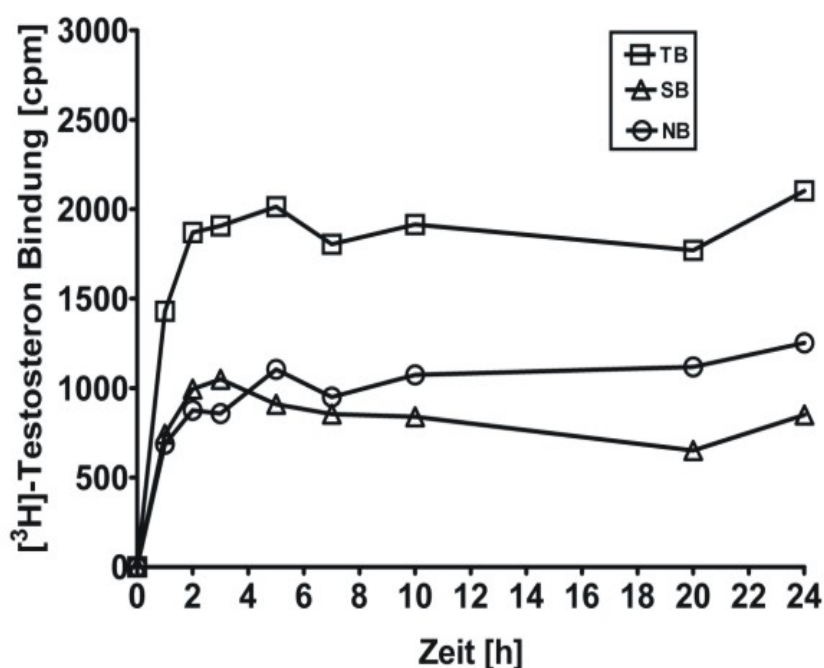
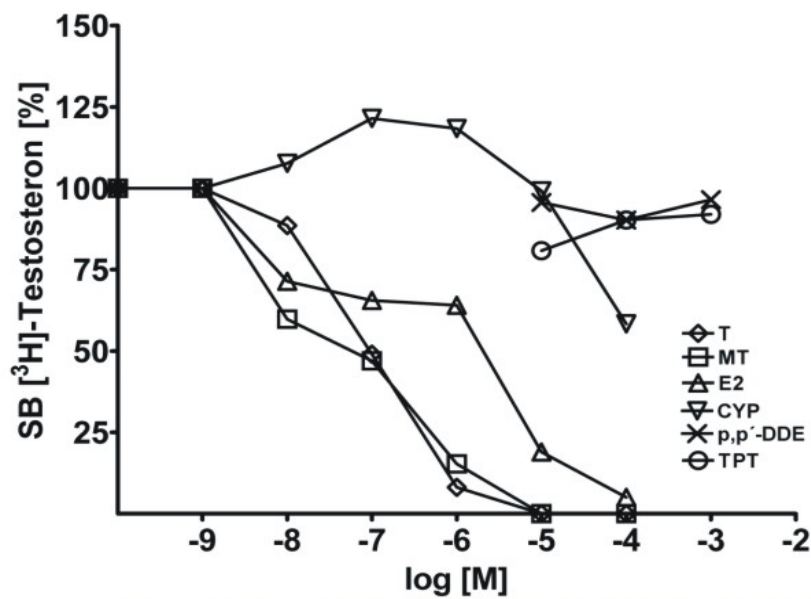


Abb. 3.6: Zeitlicher Verlauf der Bindung von  $[^3\text{H}]\text{-T}$  an die Androgenrezeptoren aus dem Lebercytosol eines 2+ Plötzenmännchens bei 4°C. Die eingesetzte Konzentration des  $[^3\text{H}]\text{-T}$  beträgt 5,0 nM.

### 3.1.2 Konkurrenzexperimente

Konkurrenzexperimente ermöglichen es, die Rezeptoren hinsichtlich ihrer Affinität für verschiedene Liganden zu spezifizieren. Um die kompetitiven Verdrängungen der  $[^3\text{H}]\text{-Testosteron}$ bindung an Androgenrezeptoren im Gonaden- bzw. Lebercytosol zu erfassen, wurden für die Experimente jeweils sieben männliche und sieben weibliche Plötzen eingesetzt. Obwohl die Bindungen auch hier keine geschlechterspezifischen Unterschiede zeigten, werden die Ergebnisse dennoch nach Geschlechter getrennt aufgeführt. Die eingesetzten Liganden sind in der gleichen Konzentrationsspanne eingesetzt worden, wie der natürliche Ligand T, nämlich von  $10^{-4}$  M bis  $10^{-9}$  M. Ausnahmen waren die beiden Substanzen TPT und p,p'-DDE, die in Konzentrationen von  $10^{-3}$  M bis  $10^{-5}$  M eingesetzt wurden. Als Positivkontrolle wurde T im Parallelansatz mitgeführt (Abb. 3.7). Die eingesetzten Umweltchemikalien TPT und p,p'-DDE zeigten keine Bindung an den Androgenrezeptor, CYP wies eine wesentlich geringere Bindung als die endogenen Liganden, T und E2 auf. MT hingegen zeigte die höchste Bindungsaffinität.

Die mittels eines korrespondierenden logit-log-Plots (Abb. 3.8) errechneten  $\text{IC}_{50}$ -Werte ergaben im Vergleich für die mitgeführten Liganden eine Affinitätsreihenfolge zum Androgenrezeptor wie folgt:  $\text{MT} \geq \text{T} > \text{E2} \geq \text{CYP}$ . TPT und p,p'-DDE wiesen keine Affinität zum Androgenrezeptor auf (Tab. 1).



**Abb.3.7:** Kompetitive Verdrängungsexperimente im Gonadengewebe von weiblichen 2+ Plötzen von  $[^3\text{H}]\text{-T}$  am AR bei einer Konzentration von 20,0 nM durch exogene und endogene Liganden in einer Konzentrationspanne von  $10^{-9}$  M bis  $10^{-4}$  M Cyproteronazetat (CYP), Methyltestosteron (MT) und 17- $\beta$ -Östradiol (E2). Ausnahmen sind Dichlordiphenyldichlorethylen (p,p'-DDE) und Triphenylzinn (TPT), die in Konzentrationen von  $10^{-5}$  M bis  $10^{-3}$  M eingesetzt wurden. Als Positivkontrolle ist Testosteron (T) mitgeführt worden. Dargestellt sind die Mittelwerte ( $n=7$ ) der prozentualen spezifischen Bindung (SB) von  $[^3\text{H}]\text{-T}$ .

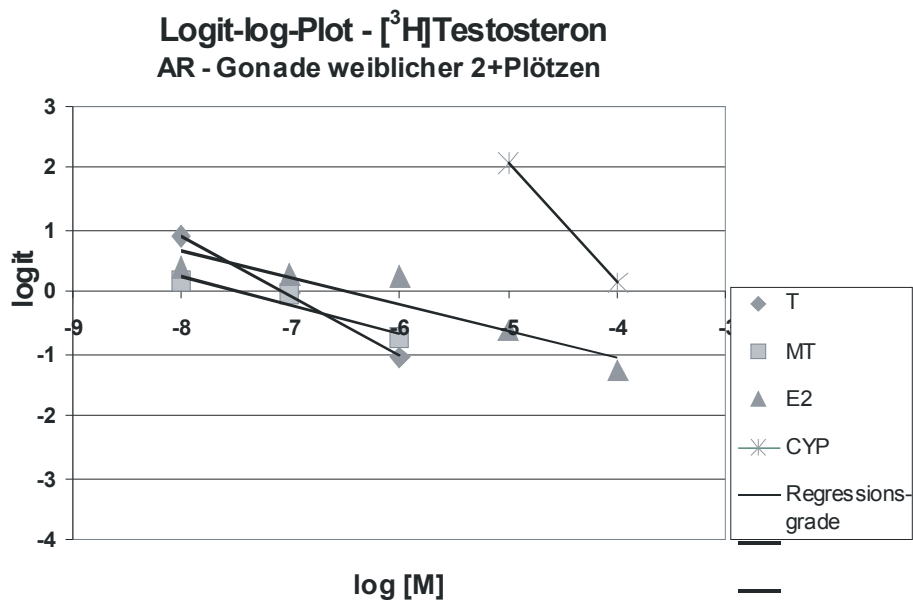
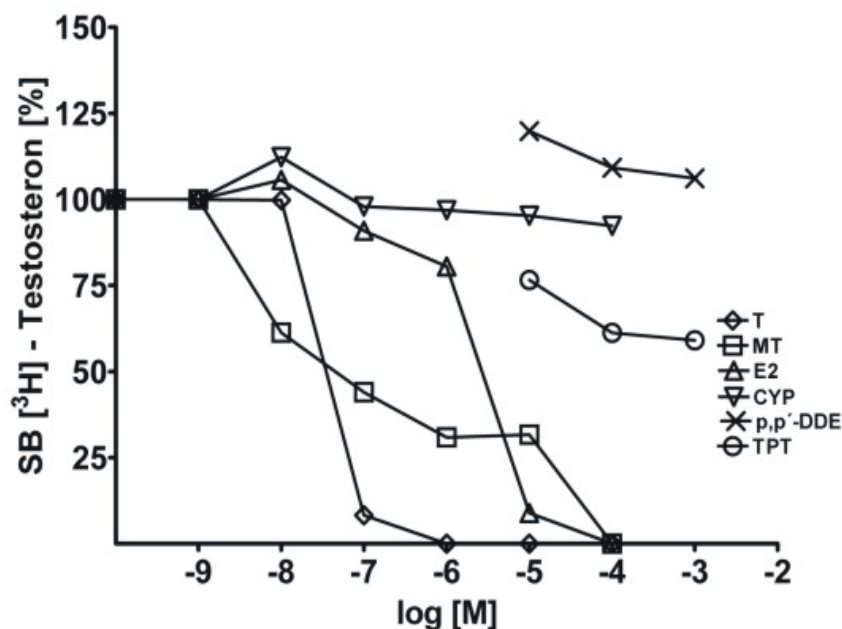


Abb. 3.8: Korrespondierender Logit-Log-Graph zu Abb.3.7. Mittels der linearen Regression koennen die  $\text{IC}_{50}$ -Werte bestimmt werden (Tab.1). TPT und p,p'-DDE koennen wegen fehlender Affinitaet zum AR nicht transformiert dargestellt werden.

Tab. 1: Korrespondierende Tabelle zu Abb.3.8. Dargestellt sind die mit Hilfe der logit-log-Transformation ermittelten  $IC_{50}$ -Werte aus den Mittelwerten ( $n=7$ ) bei weiblichen 2+ Ploetzen.

Ligand	$IC_{50}$ Werte (nM)
Methyltestosteron (MT)	579060
Testosteron (T)	856300
17 $\beta$ -OEstradiol (E2)	1564141
Cyproteronazetat (CYP)	1974591
Triphenylzinn (TPT)	---
4,4' Dichlordiphenyldichlorethylen (p,p'DDE)	---

Bei den maennlichen 2+ Ploetzen wurden die gleichen Substanzen in den gleichen Konzentrationen wie bei den Kompetitionsexperimenten mit den weiblichen 2+ Ploetzen eingesetzt (Abb. 3.9). Die  $IC_{50}$ -Werte wurden mittels des korrespondieren logit-log-Plots errechnet (Abb. 3.10). Aus den ermittelten Ergebnissen, lies sich folgende Affinitaetsreihenfolge zum Androgenrezeptor im Gonadencytosol erstellen: MT > T >> E2 > CYP. p,p'-DDE und TPT zeigten keine Affinitaet zum Androgenrezeptor (Tab.2).



**Abb. 3.9:** Kompetitive Verdrängungsexperimente, im Gonadengewebe männlicher 2+ Plötzen, von  $[^3H]$ -T am AR bei einer Konzentration von 20,0 nM durch exogene und endogene Liganden in einer Konzentrationspanne von  $10^{-9}$  M bis  $10^{-4}$  M CYP, MT und E2. Ausnahmen sind p,p'-DDE und TPT in Konzentrationen von  $10^{-5}$  M bis  $10^{-3}$  M. Als Positivkontrolle ist T mitgeführt worden. Dargestellt sind die Mittelwerte ( $n=7$ ) der prozentualen spezifischen Bindungen (SB) von  $[^3H]$ -T.

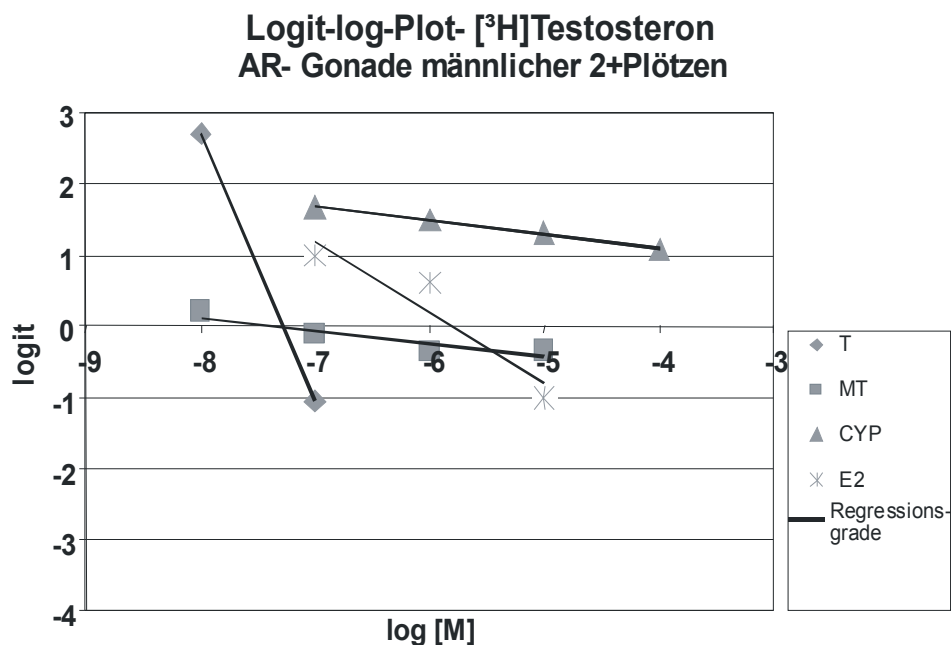


Abb. 3.10: Korrespondierender Logit-Log-Graph zu 3.9. Mittels der linearen Regression wurden die  $IC_{50}$ -Werte bestimmt (Tab.2). p,p'-DDE wurde wegen fehlender Affinität zum AR nicht transformiert dargestellt.

Tab. 2: Korrespondierende Tabelle zu Abb. 3.10. Dargestellt sind die mit Hilfe der logit-log-Transformation ermittelten  $IC_{50}$ -Werte aus den Mittelwerten (n=7) bei männlichen 2+ Plötzen.

Ligand	$IC_{50}$ -Werte (nM)
Methyltestosteron (MT)	677774
Testosteron (T)	689812
17β-Oestradiol (E2)	3030992
Cyproteronazetat (CYP)	94526672
Triphenylzinn (TPT)	---
4,4-Dichlordiphenyldichlorethylen (p,p'-DDE)	---

Aus den sieben (n=7) kompetitiven Verdrängungsexperimenten im Lebercytosol weiblicher 2+ Plötzen und den daraus resultierenden logit-log-Plots konnten folgende Reihenfolgen für die Affinität der Liganden zum Androgenrezeptor mittels der errechneten  $IC_{50}$ -Werte für die Mittelwerte (Tab. 3) erstellt werden:  $MT > T \gg E2 \geq CYP$ . Es lag keine Affinität für p,p'-DDE und TPT vor.

Tab. 3: Tabelle zu den Verdrängungsexperimenten an den Androgenrezeptoren (nicht dargestellt) im Lebercytosol. Dargestellt sind die mit Hilfe der logit-log-Transformation ermittelten  $IC_{50}$ -Werte aus den Mittelwerten (n=7) bei weiblichen 2+ Plötzen.

Ligand	$IC_{50}$ -Werte (nM)
Methyltestosteron (MT)	45711
Testosteron (T)	360938
17β-Oestradiol (E2)	2155146
Cyproteronazetat (CYP)	15736374
4,4-Dichlordiphenyldichlorethylen (p,p'-DDE)	---
Triphenylzinn (TPT)	---

Bei den maennlichen 2+ Ploetzen (n=7) ergibt sich aus den Resultaten folgende Ordnung der Liganden nach ihrer Bindungsaffinitaet an den Androgenrezeptor im Lebercytosol (Tab. 4): MT > T > E2 > CYP. p,p'-DDE und TPT zeigten keine Affinitaet zum Androgenrezeptor.

Tab. 4: Tabelle zu den Verdraengungsexperimenten an den Androgenrezeptoren (nicht dargestellt) im Lebercytosol. Dargestellt sind die mit Hilfe der logit-log-Transformation ermittelten IC<sub>50</sub>-Werte aus den Mittelwerten (n=7) bei maennlichen 2+ Ploetzen.

Ligand	IC <sub>50</sub> -Werte (nM)
Methyltestosteron (MT)	98563
Testosteron (T)	142127
17β-Oestradiol (E2)	2589572
Cyproteronazetat (CYP)	14382532
Triphenylzinn (TPT)	---
4,4-Dichlordiphenyldichlorethylen (p,p'-DDE)	---

## 3.2 In vivo Expositionen larvaler *R. rutilus*

### 3.2.1 Mortalitaetsraten der in vivo Expositionen 1 (EX1) und 2 (EX2)

Die Raten der Mortalitaet betrugen in der EX1:

Tab. 5: Mortalitaetsraten der ersten Exposition larvaler Ploetzen ueber einen Zeitraum von 210 Tagen (EX1).

Substanz [M]	Mortalitaetsrate [%]	Gestorbene Tiere [n]
1) SoCo	0,00	0
2) SoCo	0,00	0
1) TPT 10 <sup>-8</sup>	0,00	0
2) TPT 10 <sup>-8</sup>	0,00	0
1) TPT 0,5 * 10 <sup>-8</sup>	0,00	0
2) TPT 0,5 * 10 <sup>-8</sup>	80,0	24
1) TPT 10 <sup>-9</sup>	0,00	0
2) TPT 10 <sup>-9</sup>	0,00	0
1) TPT 0,5 * 10 <sup>-9</sup>	0,00	0
2) TPT 0,5 * 10 <sup>-9</sup>	0,00	0
1) VIN 10 <sup>-8</sup>	0,00	0
2) VIN 10 <sup>-8</sup>	3,33	1
1) VIN 0,5 * 10 <sup>-8</sup>	6,60	2

2) VIN $0,5 * 10^{-8}$	0,00	0
1) VIN $10^{-9}$	6,60	2
2) VIN $10^{-9}$	0,00	0
1) VIN $0,5 * 10^{-9}$	3,33	1
1) FEN $10^{-8}$	0,00	0
2) FEN $10^{-8}$	0,00	0
1) FEN $0,5 * 10^{-8}$	0,00	0
2) FEN $0,5 * 10^{-8}$	0,00	0
1) FEN $10^{-9}$	6,60	2
2) FEN $10^{-9}$	0,00	0
1) FEN $0,5 * 10^{-9}$	0,00	0

Die Mortalitätsraten in der EX2 betrugen:

Tab. 6: Mortalitätsraten der zweiten Exposition larvaler Ploetzen ueber einen Zeitraum von 210 Tagen (EX2).

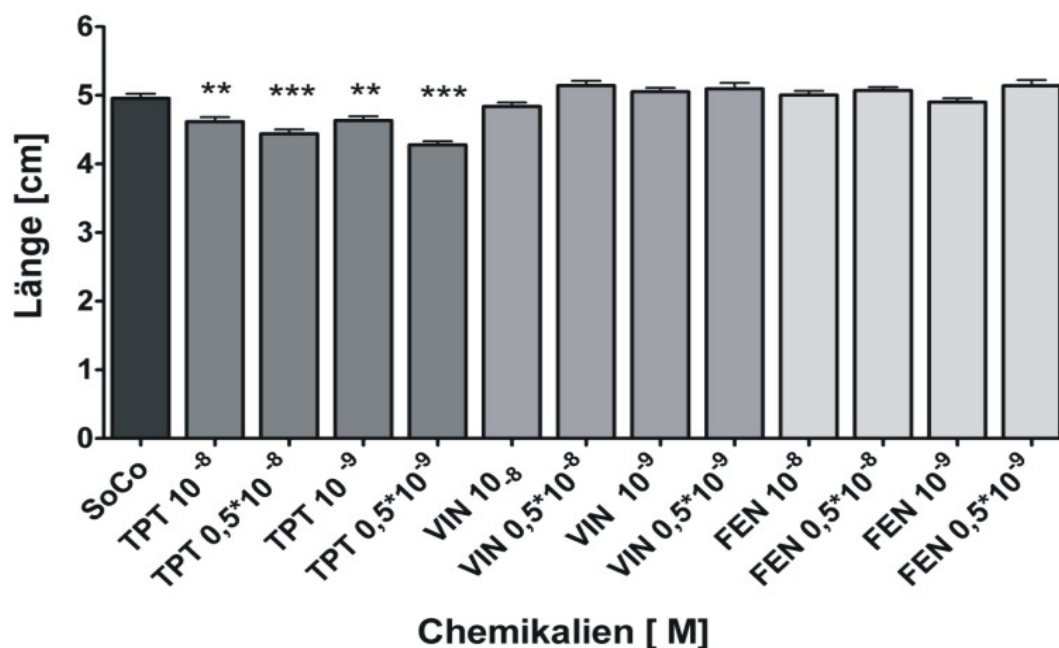
Substanz [M]	Mortalitätsrate [%]	Gestorbene Tiere [n]
1) SoCo	0,00	0
2) SoCo	0,00	0
1) MT $10^{-8}$	0,00	0
2) MT $10^{-8}$	0,00	0
1) MT $0,5 * 10^{-8}$	0,00	0
2) MT $0,5 * 10^{-8}$	0,00	0
1) MT $10^{-9}$	0,00	0
2) MT $10^{-9}$	0,00	0
1) MT $0,5 * 10^{-9}$	0,00	0
2) MT $0,5 * 10^{-9}$	0,00	0
1) CYP $10^{-8}$	0,00	0
2) CYP $10^{-8}$	0,00	0
1) CYP $0,5 * 10^{-8}$	0,00	0

2) CYP $0,5 * 10^{-8}$	0,00	0
1) CYP $10^{-9}$	0,00	0
2) CYP $10^{-9}$	0,00	0
1) CYP $0,5 * 10^{-9}$	0,00	0
2) CYP $0,5 * 10^{-9}$	0,00	0
1) LET $10^{-8}$	0,00	0
2) LET $10^{-8}$	0,00	0
1) LET $0,5 * 10^{-8}$	0,00	0
2) LET $0,5 * 10^{-8}$	0,00	0
1) LET $10^{-9}$	0,00	0
2) LET $10^{-9}$	0,00	0
1) LET $0,5 * 10^{-9}$	0,00	0
2) LET $0,5 * 10^{-9}$	0,00	0

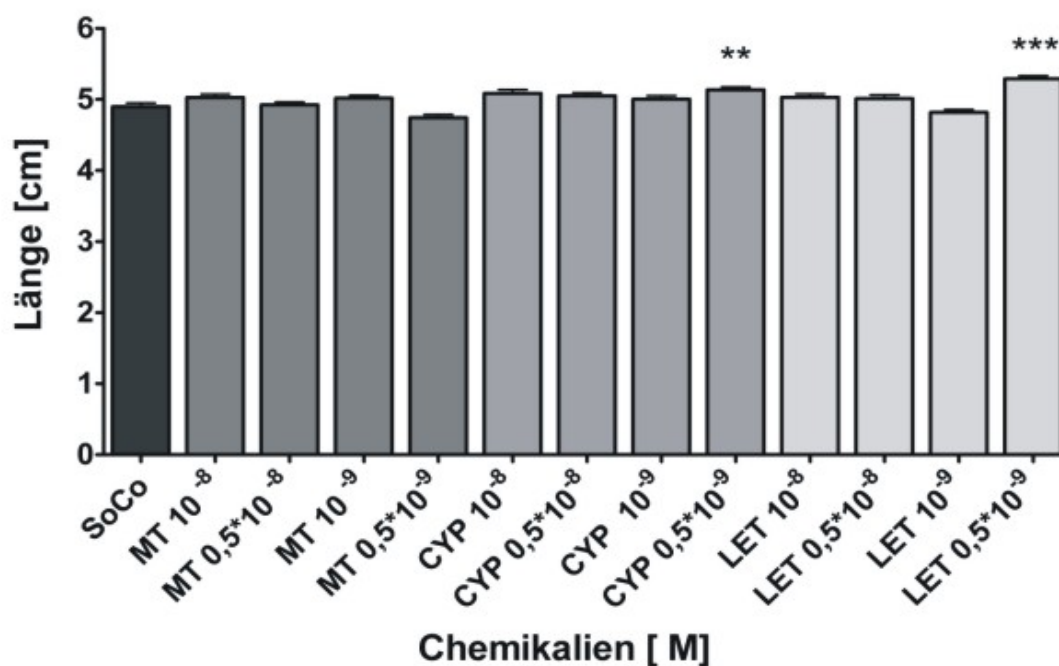
### 3.2.2 Totallaengen

Die Mittelwerte der Totallaengen larvaler Ploetzen von den Expositionen 1 (EX1) und 2 (EX2) wurden im Verhaeltnis zur jeweiligen SoCo verglichen. Alle eingesetzten Konzentrationen von TPT fuehrten zu einer signifikanten Hemmung des Wachstums in der EX1 (Abb. 3.11). Die jeweils niedrigsten Konzentrationen von CYP  $0,5*10^{-9}$  M und LET  $0,5*10^{-9}$  M steigerten das Wachstum im Vergleich zur Loesungsmittelkontrolle in der EX2 signifikant (Abb. 3.12).





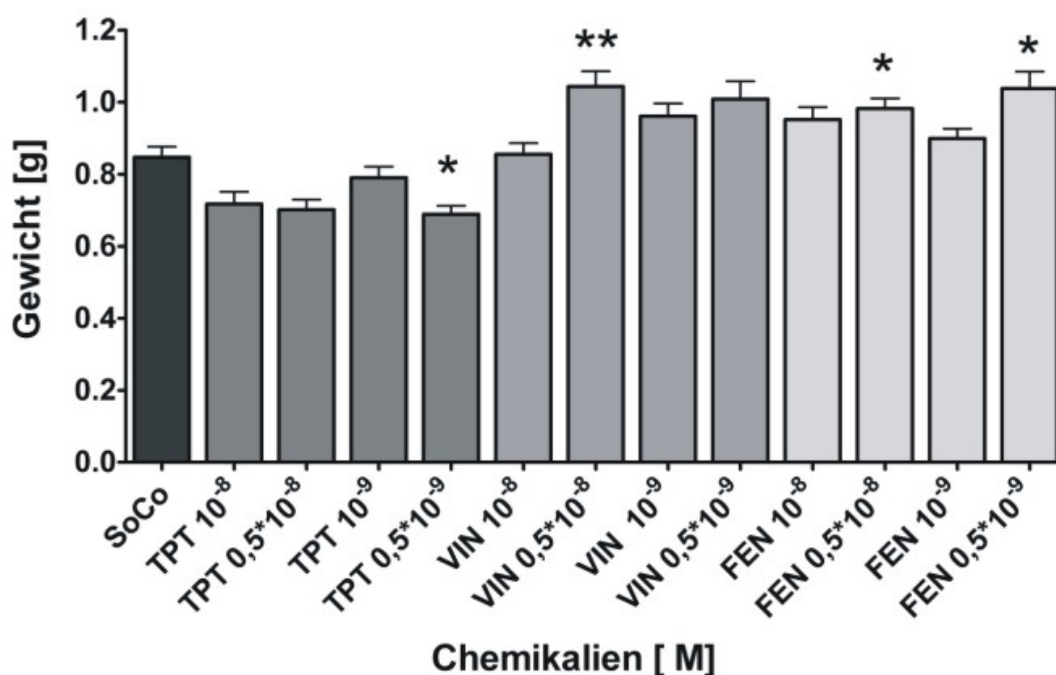
**Abb. 3.11:** Darstellung der Mittelwerte (MW  $\pm$  SEM) der gemessenen Totallängen nach 210 Tagen Exposition mit Triphenylzinn (TPT), Vinclozolin (VIN) und Fenarimol (FEN) in einer Konzentrationsspanne von  $10^{-8}$  M bis  $0,5 \cdot 10^{-9}$  M. Signifikante Unterschiede zur Lösungsmittelkontrolle (SoCo) nach dem Dunn's Test wurden mit \*\* ( $p < 0,01$ ) und \*\*\* ( $p < 0,001$ ) gekennzeichnet.



**Abb. 3.12:** Darstellung der Mittelwerte (MW  $\pm$  SEM) der gemessenen Totallängen nach 210 Tagen Exposition (EX2) in MT, CYP und LET bei einer Konzentrationsspanne von  $10^{-8}$  M bis  $0,5 \cdot 10^{-9}$  M. Signifikante Unterschiede zur SoCo nach dem Dunn's Test wurden mit \*\* ( $p < 0,01$ ) und \*\*\* ( $p < 0,001$ ) gekennzeichnet.

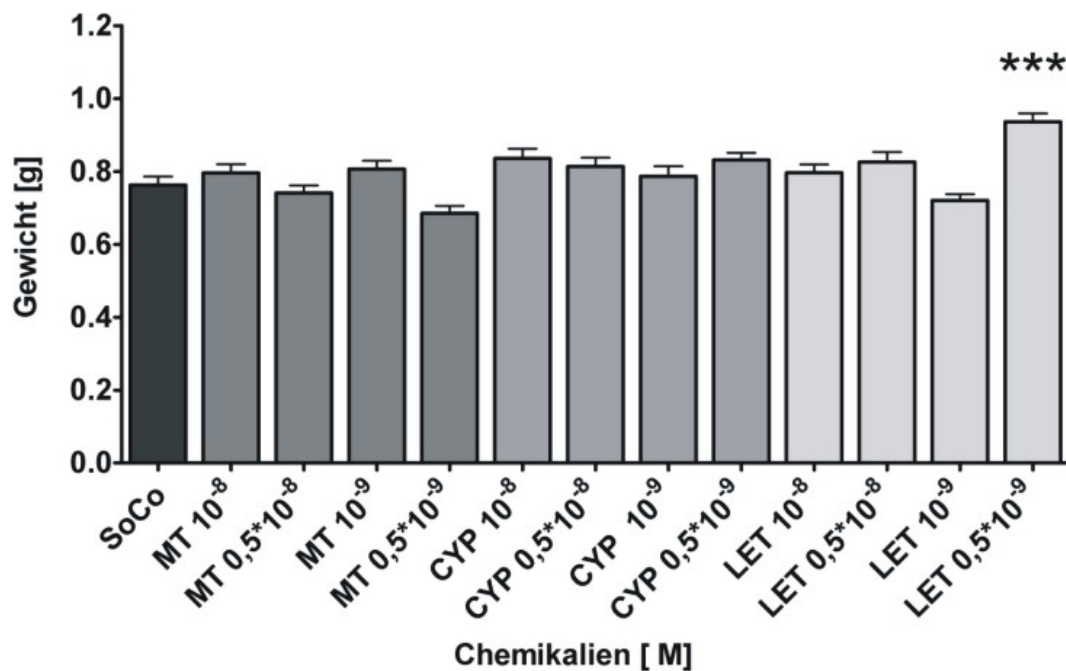
### 3.2.3 Gewicht

Das Gewicht der larvalen Ploetzen wurde nach 210 Tagen ermittelt. Daraus ergab sich bei der EX1, dass bezogen auf die Mittelwerte der SoCo, TPT in allen Konzentration das Gewicht reduziert, wobei nur bei der niedrigsten Konzentration (TPT  $0,5 \cdot 10^{-9}$  M) ein signifikanter Unterschied vorhanden war. VIN und FEN fuehrten bei allen Konzentrationen zu einer tendenziellen Gewichtszunahme der larvalen Ploetzen, aber nur bei einer Vinclozolin-konzentration (VIN  $0,5 \cdot 10^{-8}$  M) und zwei Konzentrationen von Fenarimol (FEN  $0,5 \cdot 10^{-8}$  M und FEN  $0,5 \cdot 10^{-9}$  M) unterscheiden sich die Ergebnisse signifikant zur Loesungsmittelkontrolle (Abb. 3.13).



**Abb. 3.13:** Darstellung der Mittelwerte (MW  $\pm$  SEM) der gemessenen Gewichte in Gramm nach 210 Tagen Exposition (EX1) mit TPT, VIN und FEN bei einer Konzentrationsspanne von  $10^{-8}$  M bis  $0,5 \cdot 10^{-9}$  M. Signifikante Unterschiede zur SoCo nach dem Dunn's Test wurden mit \* ( $p < 0,05$ ) und \*\* ( $p < 0,01$ ) gekennzeichnet.

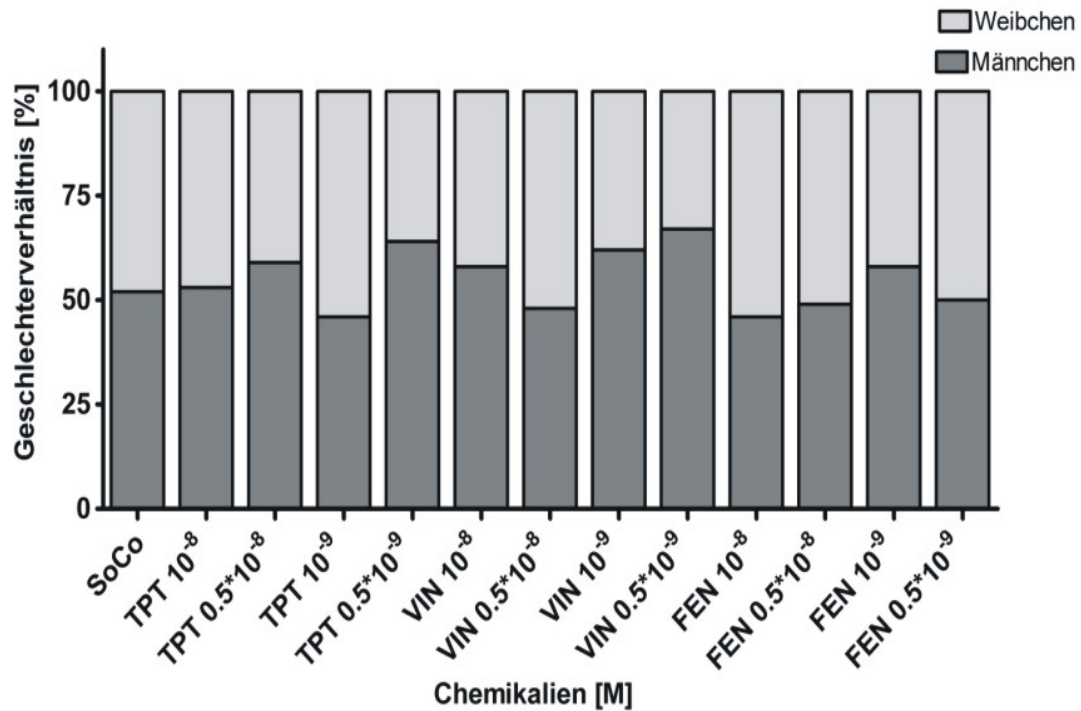
Bei der larvalen in vivo EX2 konnte nach 210 Tage bei der niedrigsten Konzentration von Letrozol (LET  $0,5 \cdot 10^{-9}$  M) bei der Endpunktmessung eine signifikanten Zunahme des Gewichtes festgestellt werden (Abb. 3.14).



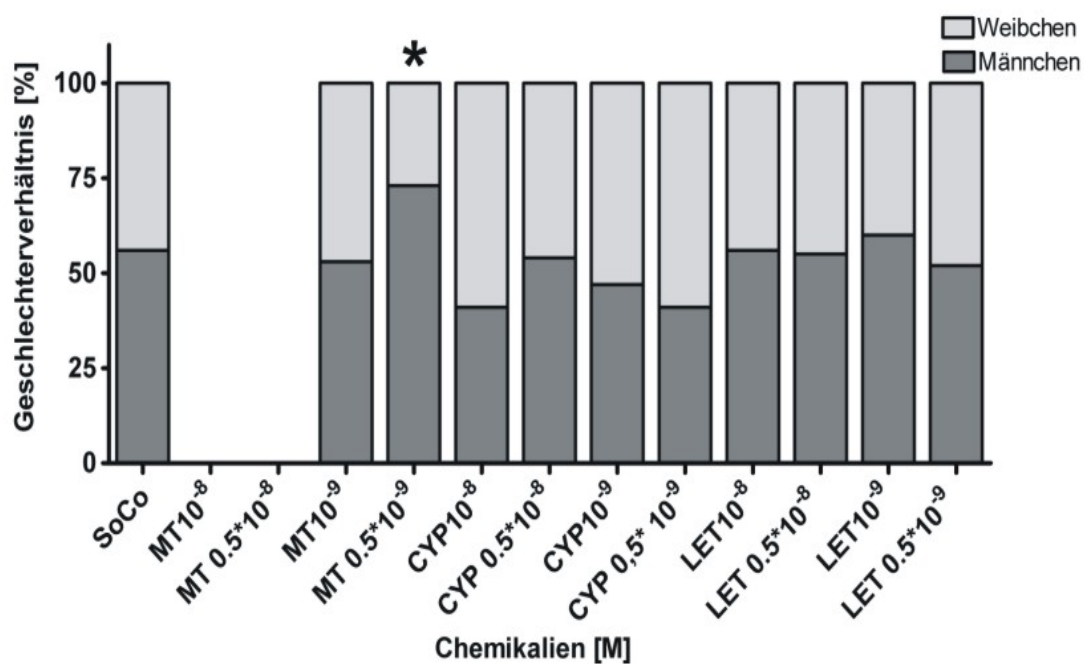
**Abb. 3.14:** Darstellung der Mittelwerte (MW ± SEM) der gemessenen Gewichte der larvalen Plötzen nach 210 Tagen Exposition mit MT, CYP und LET bei einer Konzentrationsspanne von 10<sup>-8</sup> M bis 0,5\*10<sup>-9</sup> M. Signifikante Unterschiede zur SoCo nach dem Dunn's Test wurden mit \*\*\* (p < 0,001) gekennzeichnet.

### 3.2.4 Geschlechtsdifferenzierung

Die in vivo eingesetzten Ploetzchen (n=60/Konzentration) wurden nach 210 Tagen Exposition mit verschiedenen Substanzen unterschiedlicher Konzentrationen auf ihre Geschlechtsdifferenzierung untersucht. Das Geschlechterverhaeltnis der larvalen Ploetzchen der EX1 wurde bestimmt und zeigte keine signifikanten Unterschiede zur Loesungsmittelkontrolle (Abb. 3.15). Die ebenfalls nach 210 Tagen beprobten larvalen Ploetzchen aus der zweiten Exposition (EX2) zeigten im Verhaeltnis zur Loesungsmittelkontrolle bei der niedrigsten Konzentration von Methyltestosteron (MT 0,5\*10<sup>-9</sup> M) signifikante Unterschiede. 73 % der 60 Ploetzchen entwickelten maennliche Gonaden und nur 27 % weibliche. Bei den beiden hoechsten eingesetzten Konzentrationen von Methyltestosteron (MT 0,5\*10<sup>-8</sup> M und MT 10<sup>-8</sup> M) entwickelten sich keine oder nur in wenigen Faellen (n = 8) rudimentaere Gonaden (Abb. 3.16).



**Abb. 3.15:** Prozentuales Geschlechterverhältnis larvaler Plötzen (n=60) nach 210 Tagen Exposition mit TPT, VIN und FEN bei einer Konzentrationsspanne von  $10^{-8}$  M bis  $0,5 \cdot 10^{-9}$  M. Es zeigen sich keine signifikanten Unterschiede zur SoCo.



**Abb. 3.16:** Prozentuales Geschlechterverhältnis larvaler Plötzen (n=60) nach 210 Tagen Exposition mit MT, CYP und LET bei einer Konzentrationsspanne von  $10^{-8}$  M bis  $0,5 \cdot 10^{-9}$  M. Signifikanten Unterschiede zur SoCo wurden nach dem Dunn's Test mit \* ( $p < 0,05$ ) gekennzeichnet. In zwei Gruppen, MT  $10^{-8}$  M und MT  $0,5 \cdot 10^{-8}$  M, wurden keine Gonaden entwickelt.

### 3.2.5 Genexpression mittels Reverse Transkriptase-Polymerase-Ketten-Reaktion (RT-PCR)

Bei *Rutilus rutilus* nicht vorhandene Sequenzen fuer LH, FSH, AR und EF 1 $\alpha$  wurden von bekannten Sequenzen artverwandter Spezies, wie dem Karpfen (*C. carpio*) abgeleitet und Primer fuer *R. rutilus* entworfen. Die PCR-Produkte wurden sequenziert und die Basenlaenge (bp) der cDNA bestimmt.

**PCR-Produkt (cDNA): ARO Produktlänge [bp]: 332 Seq.homologie [%]: 99,9 homolog *R.rutilus***

**PCR-Produkt (cDNA): LH Produktlänge [bp]: 278 Seq.homologie [%]: 97,0 homolog *C. carpio***

**PCR-Produkt (cDNA): FSH Produktlänge [bp]: 385 Seq.homologie [%]: 98,0 homolog *C. carpio***

**PCR-Produkt (cDNA): ges.ER Produktlänge [bp]: 303 Seq.homologie [%]: 99,9 homolog *R.rutilus***

**PCR-Produkt (cDNA): AR Produktlänge [bp]: 423 Seq.homologie [%]: 98,0 homolog *C. carpio***

**PCRProdukt (cDNA): EF 1alpha Produktlänge [bp]: 343 Seq.homologie [%]: 98,0 homolog *C. carpiob. 7:***

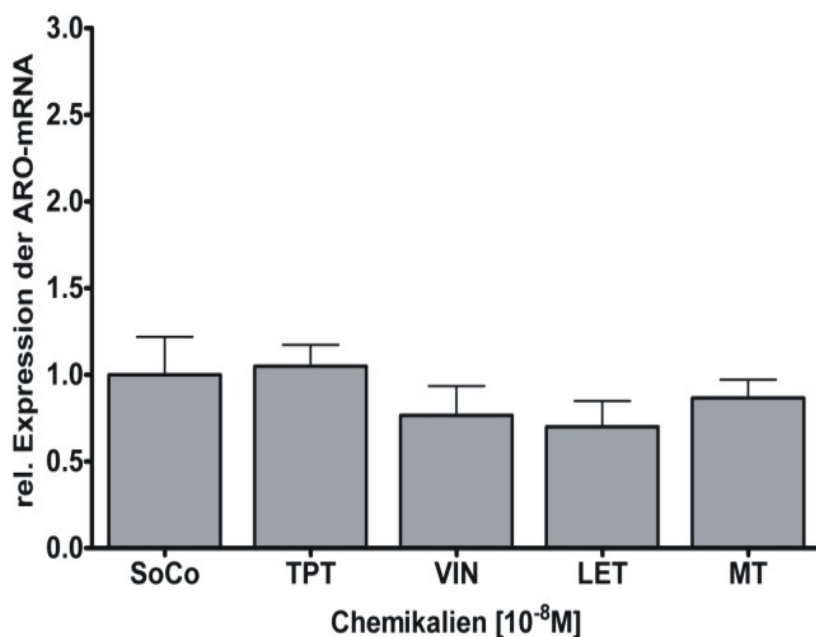
#### 3.2.5.1 Biomarker larvaler Ploetzen (*R. rutilus*)

Die PCRs wurden fuer alle gewaehlten Biomarker als Doppelbestimmung durchgefuehrt. Sechs larvale Tiere, die nach 210 Tagen Exposition beprobt wurden, gingen pro Geschlecht und Behandlungsgruppe in die Analysen ein. Bei der Exposition der Tiere mit MT bei einer Konzentration von  $10^{-8}$  M konnte aus Mangel an cDNA die LH-mRNA-Expression fuer weibliche Tiere nicht durchgefuehrt werden. Alle Ergebnisse sind als Mittelwerte mit Standardfehler dargestellt.

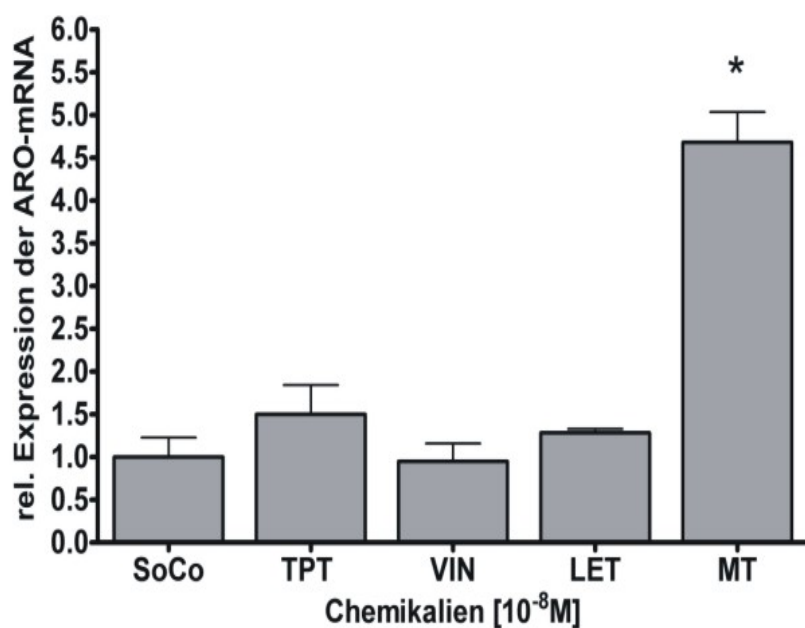
#### Aromatase (ARO)-mRNA

Bei den weiblichen larvalen Tieren kam es im Gehirn zu keinen signifikanten Unterschieden der Aromatase-mRNA-Expression (Abb. 3.17).

Bei den aus dem gleichen Versuchsansatz stammenden maennlichen Tieren zeigte sich, dass MT die Expression von ARO-mRNA signifikant steigerte (Abb. 3.18).



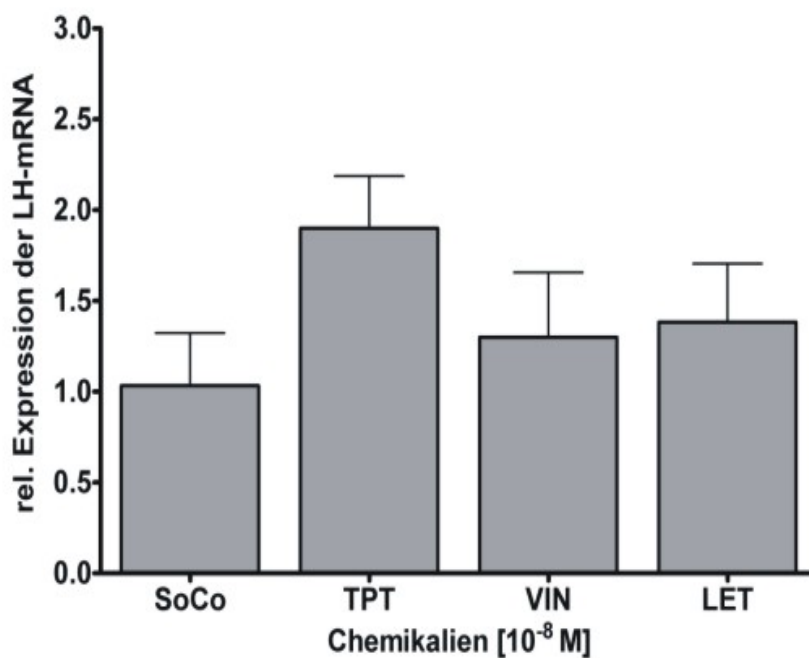
**Abb. 3.17:** Aromatase-mRNA-Expression (Aro-mRNA). Dargestellt ist die relative Expression im Gehirn weiblicher larvaler Plötzen (n=6/Behandlungsgruppe) im Verhältnis zur Lösungsmittelkontrolle (SoCo) nach 210 Tagen Exposition mit Triphenylzinn (TPT), Vinclozolin (VIN), Letrozol (LET) und Methyltestosteron (MT) bei einer Konzentration von 10<sup>-8</sup> M.



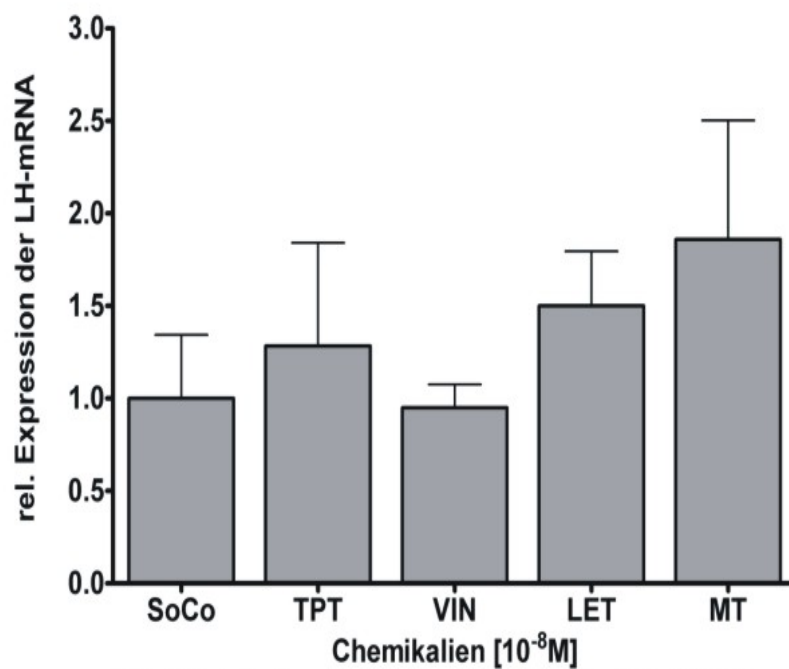
**Abb. 3.18:** Aromatase-mRNA-Expression (Aro-mRNA). Dargestellt ist die relative Expression im Gehirn männlicher larvaler Plötzen (n=6/Behandlungsgruppe) im Verhältnis zur SoCo nach 210 Tagen Exposition mit TPT, VIN, LET und MT bei einer Konzentration von 10<sup>-8</sup> M. Signifikante Unterschiede zur SoCo sind nach dem Dunn's Test mit \* (p < 0,05) gekennzeichnet.

### Luteinisierendes Hormon (LH)-mRNA

Bei der Bestimmung der LH-mRNA aus dem Gehirngewebe weiblicher und männlicher larvaler Ploetzen konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden. Da die Tiere, die nach der 210-tägigen Exposition mit MT bei einer Konzentration von  $10^{-8}$  M, entweder männlichen Geschlechts waren oder keine Gonaden entwickelt hatten, konnte keine Expression von LH-mRNA für das weibliche Geschlecht bestimmt werden. Daher sind hier nur die Ergebnisse für weibliche larvale Ploetzen aus den Expositionen in Konzentrationen von  $10^{-8}$  M mit TPT, VIN und LET im Verhältnis zur SoCo gezeigt (Abb. 3.19). Die MT-Konzentration von  $10^{-9}$  M, bei der es zu einer Gonadenentwicklung kam und eine Geschlechterdifferenzierung möglich war, zeigte, dass die Ergebnisse nicht signifikant unterschiedlich waren (nicht dargestellt). Die Ergebnisse der Expression der LH-mRNA der männlichen larvalen Tiere bei  $10^{-8}$  M hingegen sind auch für MT dargestellt (Abb. 3.20).



**Abb. 3.19:** Luteinisierendes Hormon-mRNA-Expression (LH-mRNA). Dargestellt ist die relative Expression im Gehirngewebe weiblicher larvaler Plötzen (n=6/Behandlungsgruppe) im Verhältnis zur SoCo nach 210 Tagen Exposition mit TPT, VIN und LET bei einer Konzentration von  $10^{-8}$  M.

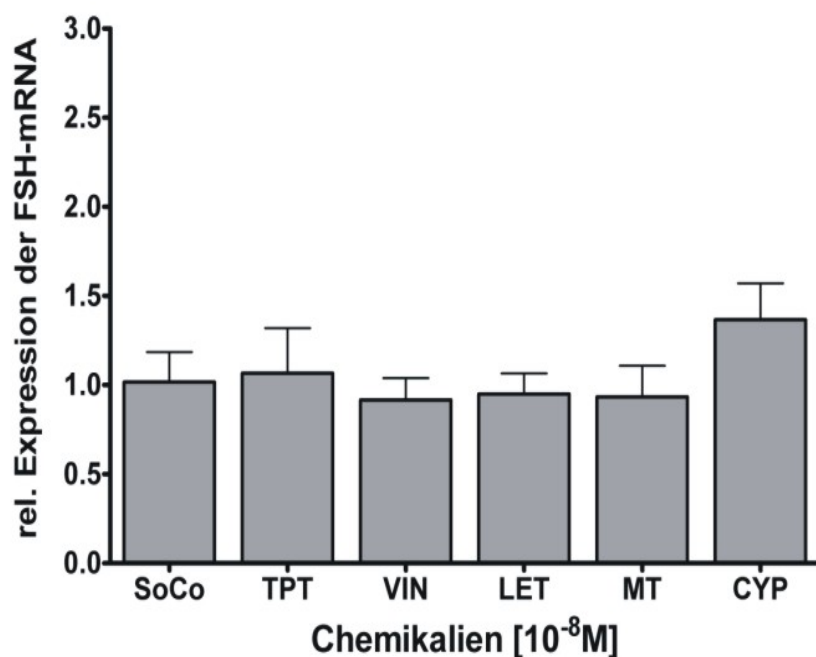


**Abb. 3.20:** Luteinisierendes Hormon-mRNA-Expression (LH-mRNA). Dargestellt ist die relative Expression im Gehirn männlicher larvaler Plötzen ( $n=6$ /Behandlungsgruppe) im Verhältnis zur SoCo nach 210 Tagen Exposition mit TPT, VIN, LET und MT bei einer jeweiligen Konzentration von  $10^{-8}$  M.

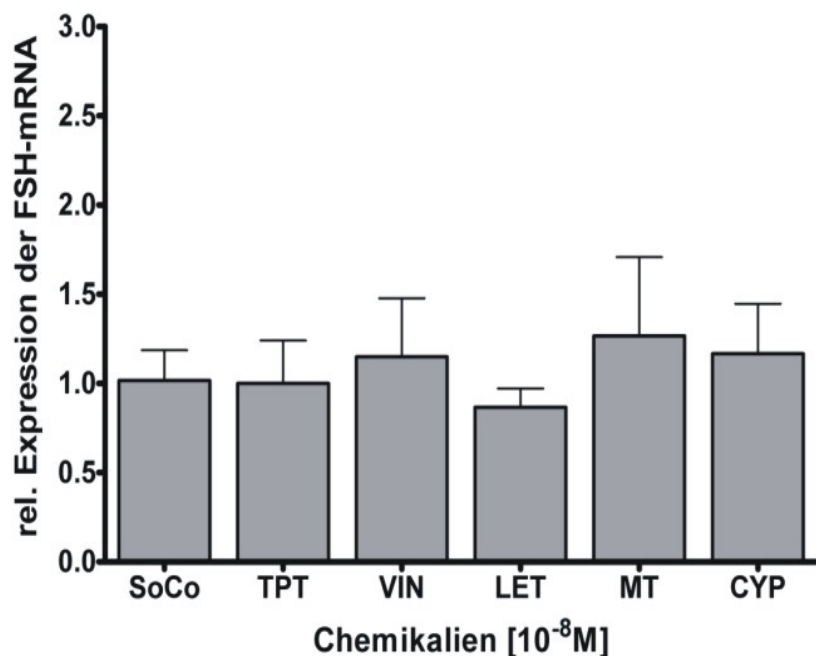
#### **Follikelstimulierendes Hormon (FSH)-mRNA**

Die Ergebnisse fuer die FSH-mRNA-Expression der Tiere, die bei einer Konzentration von  $10^{-8}$  M exponiert wurden, wiesen keine signifikanten Unterschiede, weder fuer die weiblichen (Abb. 3.21) noch fuer die maennlichen Tiere (Abb. 3.22), auf.





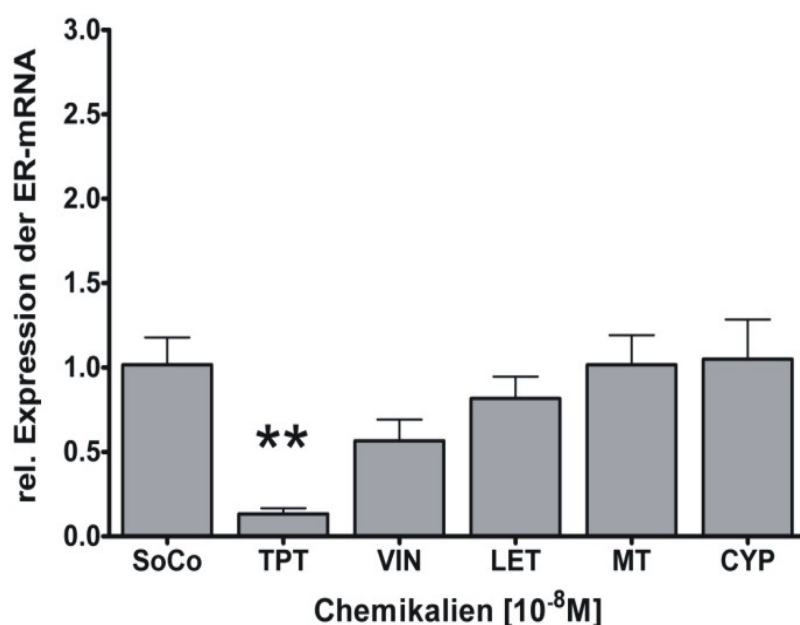
**Abb. 3.21:** Follikel stimulierendes Hormon-mRNA-Expression (FSH-mRNA). Dargestellt ist die relative Expression im Gehirn weiblicher larvaler Plötzen (n=6/Behandlungsgruppe) im Verhältnis zur SoCo nach 210 Tagen Exposition mit TPT, VIN, LET, MT, CYP und FEN bei einer Konzentration von 10<sup>-8</sup> M.



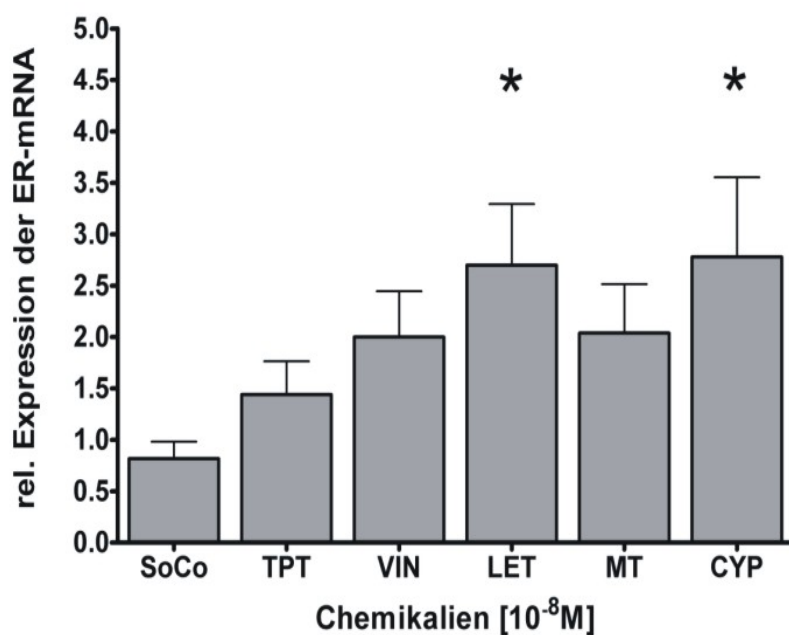
**Abb. 3.22:** Follikel stimulierendes Hormon-mRNA-Expression (FSH-mRNA). Dargestellt ist die relative Expression im Gehirn männlicher larvaler Plötzen (n=6/Behandlungsgruppe) im Verhältnis zur SoCo nach 210 Tagen Exposition mit TPT, VIN, LET, MT und CYP bei einer Konzentration von 10<sup>-8</sup> M.

### Oestrogenrezeptor (ER)-mRNA

Die ER-mRNA-Expression auf zellulärer Ebene bei den larvalen Tieren wurde in der Leber gemessen. Bei den weiblichen larvalen Tieren zeigte sich nach der 210-tägigen Exposition mit Chemikalien in Konzentrationen von  $10^{-8}$  M, dass die mRNA-Expression im Falle von TPT signifikant gehemmt wurde (Abb. 3.23). Bei zwei weiteren Substanzen, LET und CYP, konnte im Lebergewebe männlicher larvaler Plötzen eine signifikante Steigerung der ER-mRNA-Expression nachgewiesen werden (Abb. 3.24).



**Abb. 3.23:** Östrogen-Rezeptor-mRNA-Expression (ER-mRNA). Dargestellt ist die relative Expression in der Leber weiblicher larvaler Plötzen ( $n=6$ /Behandlungsgruppe) im Verhältnis zur SoCo nach 210 Tagen Exposition mit TPT, VIN, LET, MT und CYP bei einer Konzentration von  $10^{-8}$  M. Signifikante Unterschiede zur SoCo nach dem Dunnetts-Test sind mit \*\* ( $p<0,01$ ) gekennzeichnet.

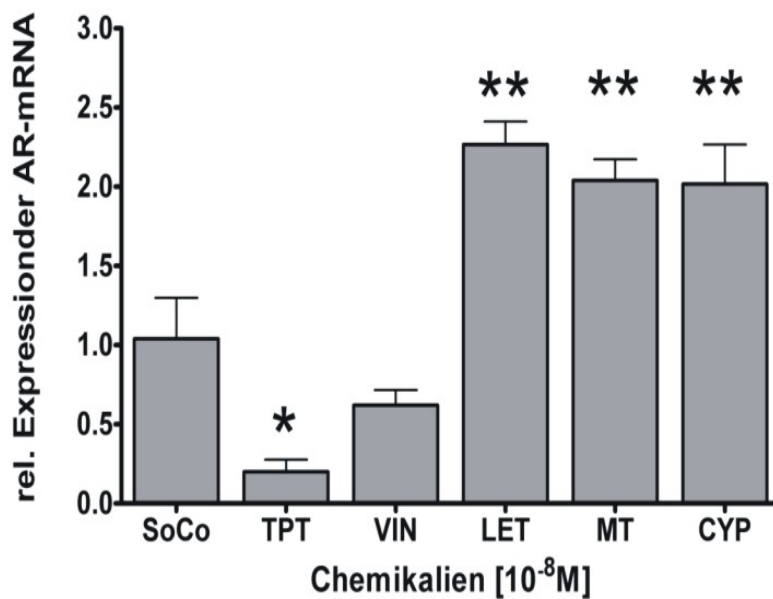


**Abb. 3.24:** Östrogen-Rezeptor-mRNA-Expression (ER-mRNA). Dargestellt ist die relative Expression in der Leber männlicher larvaler Plötzen (n=6/Behandlungsgruppe) im Verhältnis zur SoCo nach 210 Tagen Exposition mit TPT, VIN, LET, MT und CYP bei einer Konzentration von  $10^{-8}$  M. Signifikante Unterschiede zur SoCo nach dem Dunnetts-Test sind mit \* ( $p < 0,05$ ) gekennzeichnet.

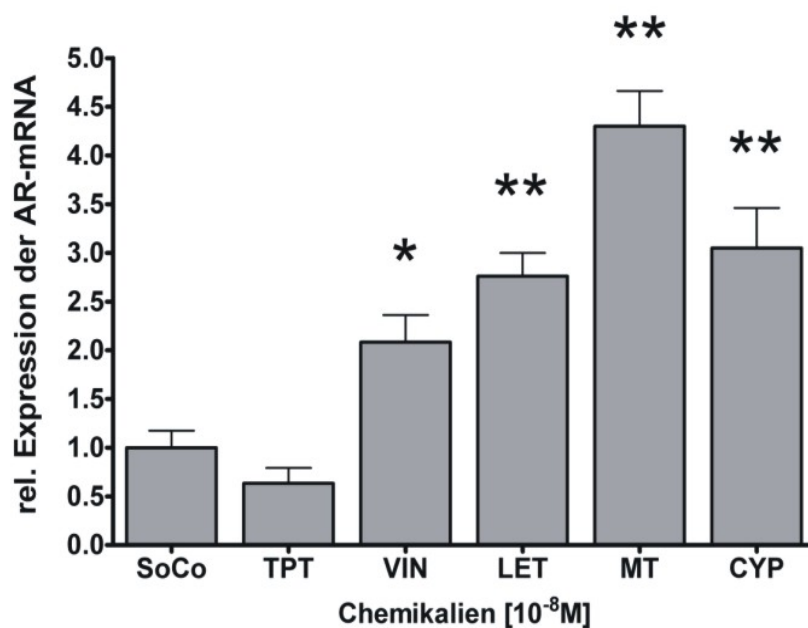
### Androgenrezeptor (AR)-mRNA

Signifikant unterschiedlich zur Lösungsmittelkontrolle zeigte sich die AR-mRNA-Expression im Lebergewebe larvaler weiblicher Plötzen. TPT hemmte die Expression, während LET, MT und CYP die AR-mRNA bei der eingesetzten Konzentration von  $10^{-8}$  M steigerten (Abb. 3.25).

Bei den männlichen larvalen Plötzen kam es durch TPT tendenziell auch zu einer Hemmung der Expression. Signifikant gesteigert zur SoCo wurde die mRNA-Expression durch VIN, LET, MT und CYP (Abb. 3.26).



**Abb. 3.25:** Androgen-Rezeptor-mRNA-Expression (AR-mRNA). Dargestellt ist die relative Expression in der Leber weiblicher larvaler Plötzen (n=6/Behandlungsgruppe) im Verhältnis zur SoCo nach 210 Tagen Exposition mit TPT, VIN, LET, MT und CYP bei einer Konzentration von 10<sup>-8</sup> M. Signifikante Unterschiede zur SoCo nach dem Dunnetts-Test sind mit \* (p<0,05) und \*\* (p<0,01) gekennzeichnet.

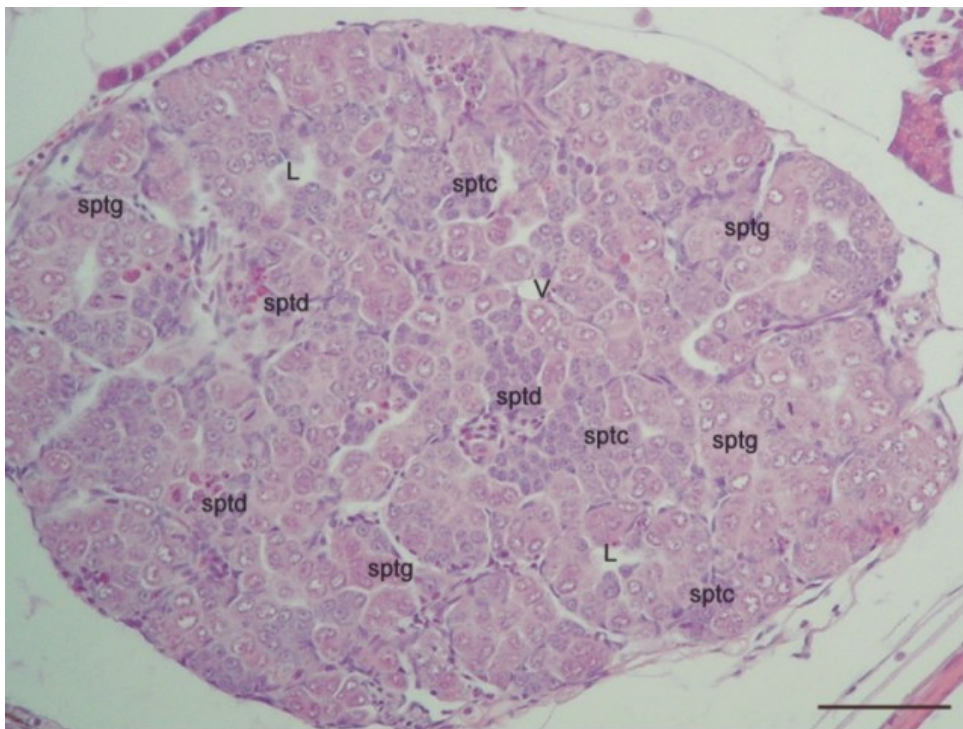


**Abb. 3.26:** Androgen-Rezeptor-mRNA-Expression (AR-mRNA). Dargestellt ist die relative Expression in der Leber männlicher larvaler Plötzen (n=6/Behandlungsgruppe) im Verhältnis zur SoCo nach 210 Tagen Exposition mit TPT, VIN, LET, MT und CYP bei einer Konzentration von 10<sup>-8</sup> M. Signifikante Unterschiede zur SoCo nach dem Dunnetts-Test sind mit \* (p<0,05) und \*\* (p<0,01) gekennzeichnet.

### 3.2.6 Histologie

Die in den Expositionen (EX1) und (EX2) in vivo exponierten Ploetzen wurden nach 210 Tagen untersucht. Hierbei wurden allen Tieren die Gonaden entnommen und nach der phenotypischen Feststellung des Geschlechtes je eine Hälfte für die Bestimmung der Biomarker eingesetzt und die andere Hälfte für histologische Untersuchungen am IGB in Berlin oder am Limnomar-Institut in Hamburg verwendet. Dargestellt sind vergleichende Hämatoxylin-Eosin-Schnitte (HE) aus den  $10^{-8}$  M Konzentrationen beider Expositionen.

Die Testes der SoCo zeigten aktive Spermatogenese mit frühen Reifungsstadien, bei denen sich Spermatogonien bis Spermatozyten zeigten (Abb. 3.27). Bei den weiblichen Tieren waren die Ovarien mit aktiver Oogenese zu sehen. Diese befanden sich ebenfalls nur in frühen Reifungsstadien, wobei Oogonien bis vitellogene Oocyten vorhanden waren (Abb. 3.28).



**Abb. 3.27:** Testis aus der SoCo. Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE).  
 sptg = Spermatogonien, sptc = Spermatozyten, sptd = Spermatiden, L = Lakunen,  
 V = Gefäß, Balken = 50µm.

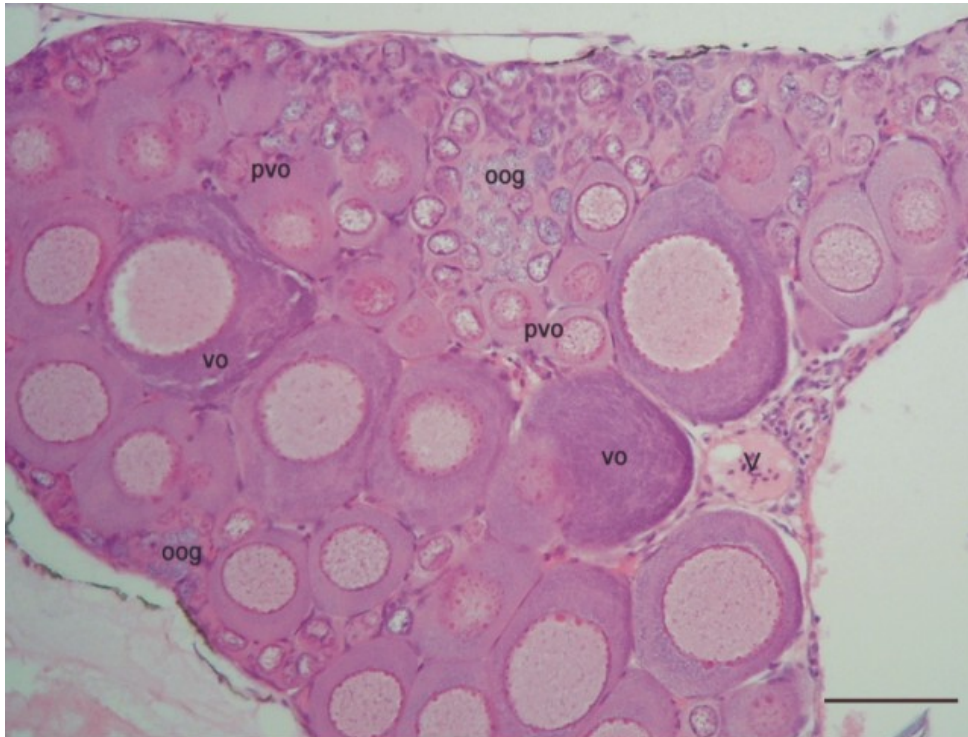
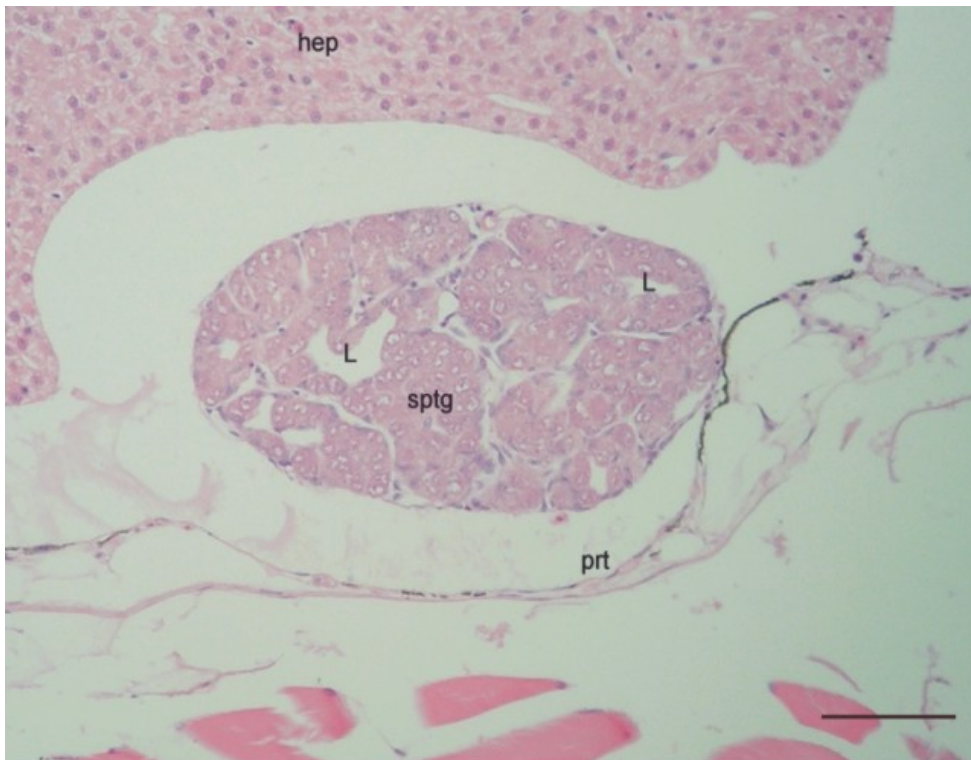


Abb. 3.28: Ovar aus der SoCo. Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE).

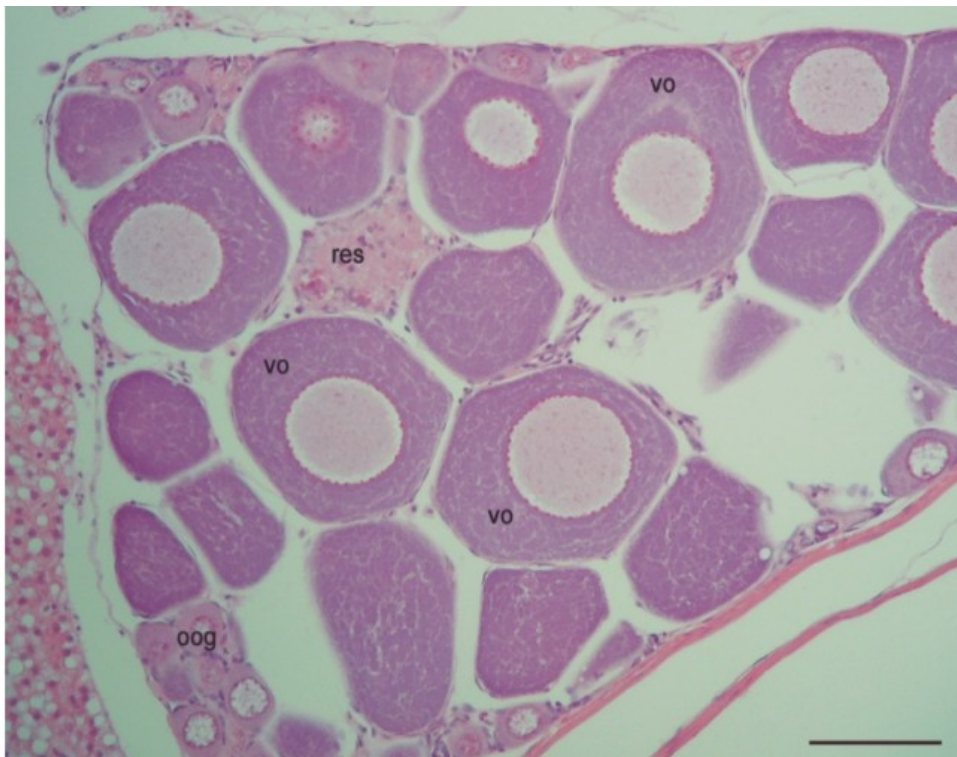
Oog = Oogonien, pvo = prävitellogene Oozyten, vo = vitellogene Oozyten, V = Gefäß,  
Balken = 50µm

Die männlichen Tiere, die über 210 Tage mit TPT exponiert waren, wiesen eine aktive Spermatogenese auf. Allerdings waren Reife und Größe der Testis reduziert und nur Spermatogonien vorhanden. Weiterhin waren stark ausgeprägte Lakunenbildungen zu beobachten (Abb. 3.29). Die Ovarien wiesen aktive Oogenese und einzelne atretische Oocyten sowie lokale Resorption von Oogonien (Abb. 3.30) auf.



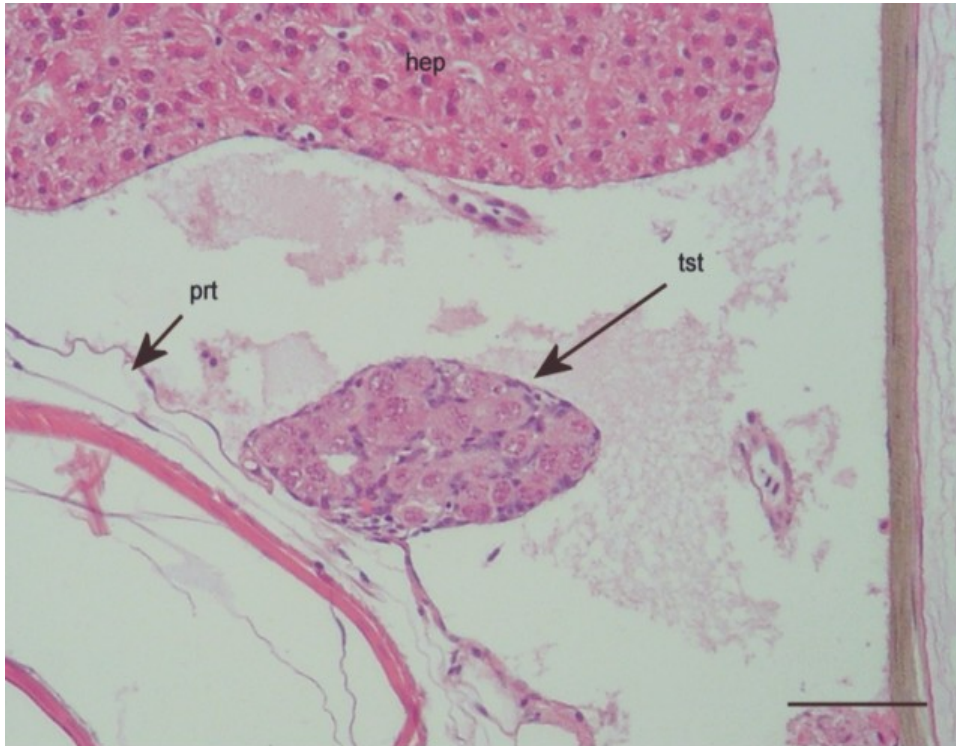


**Abb. 3.29:** Testis aus der TPT-Gruppe. Konzentration  $10^{-8}$  M. HE-Färbung. sptg = Spermatogonien, prt = Peritoneum, hep = Leber, L = Lakunen, Balken =  $50\mu\text{m}$ .

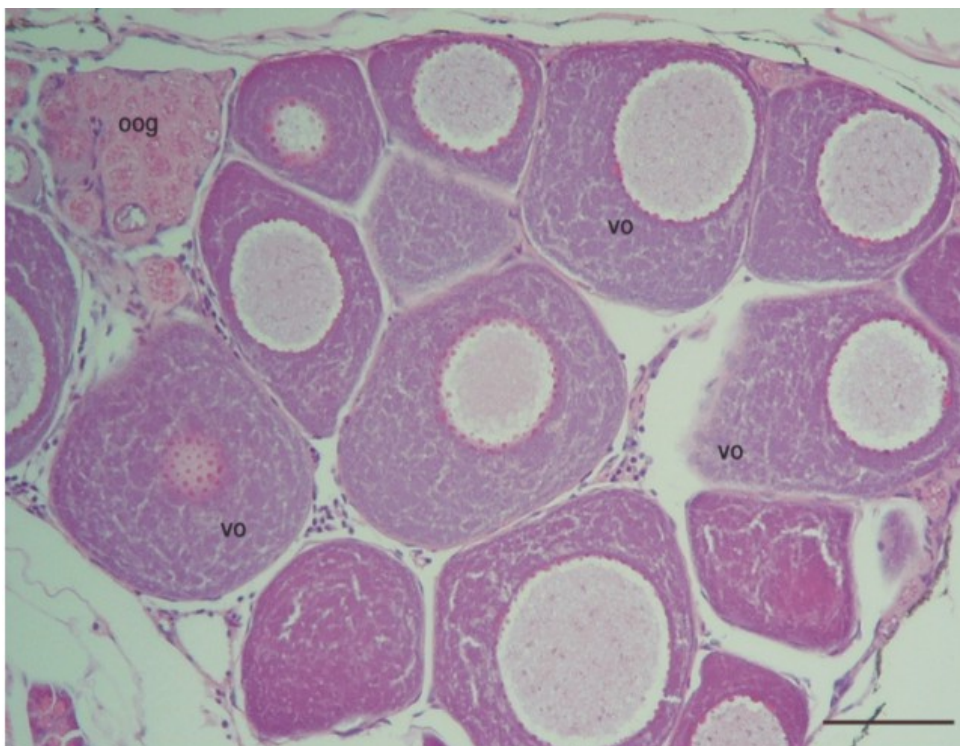


**Abb. 3.30:** Ovar nach Behandlung mit TPT  $10^{-8}$  M. HE-Färbung (HE). Oog = Oogonien, vo = vitellogene Oozyten, res = Resorption von Gameten, Balken =  $50\mu\text{m}$

VIN mit einer Konzentration von  $10^{-8}$  M führte bei den exponierten Männchen zu reduzierter Reife und Größe der Testis. Trotz aktiver Spermatogenese fanden sich nur Spermatogonien in den Testis (Abb. 3.31). In den weiblichen Tieren war eine aktive Oogenese mit normaler Reifung vorhanden (Abb. 3.32).



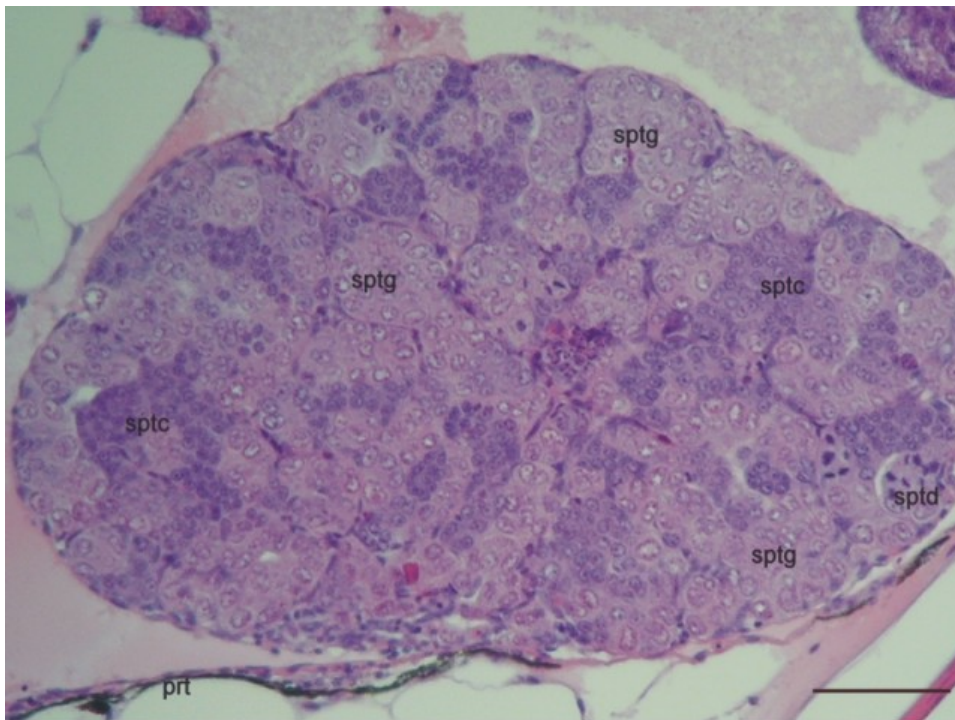
**Abb. 3.31:** Testis aus der VIN-Gruppe. Konzentration  $10^{-8}$  M. HE-Färbung. Tst = Testis, prt = Peritoneum, hep = Leber, Balken = 50 $\mu$ m.



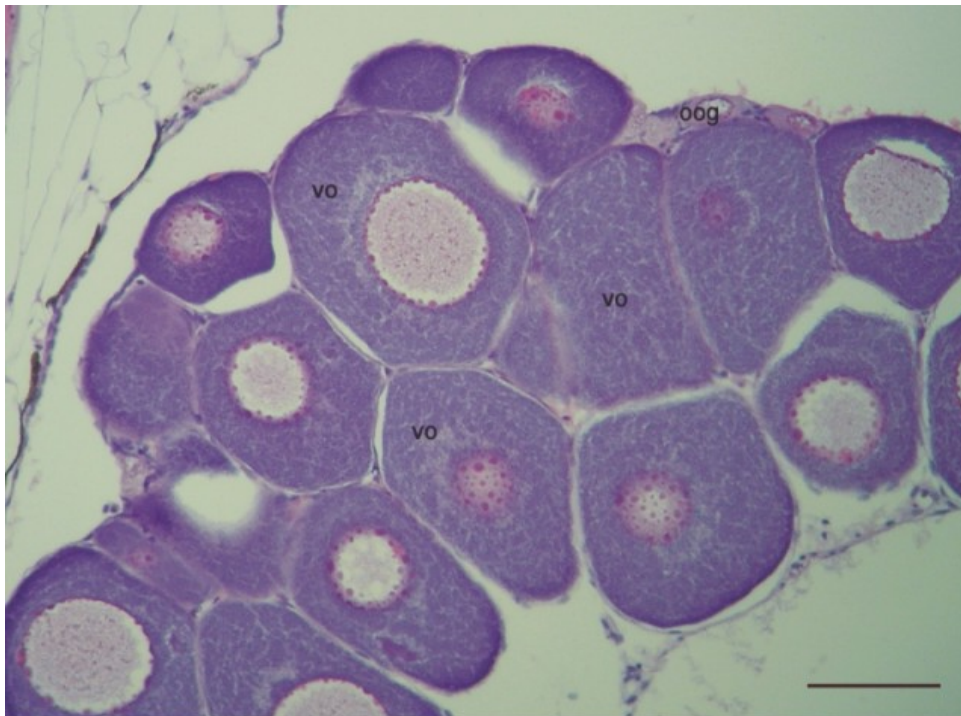
**Abb. 3.32:** Ovar nach der Behandlung mit VIN  $10^{-8}$  M. HE-Färbung. Oog = Oogonien, vo = vitellogene Oozyten, Balken = 50 $\mu$ m.



LET mit einer Konzentration von  $10^{-8}$  M führte bei den exponierten Männchen zu normaler Reife und Größe der Testis und einer aktiven Spermatogenese (Abb. 3.33). In den weiblichen Tieren war eine aktive Oogenese mit normaler Reifung vorhanden (Abb. 3.34).

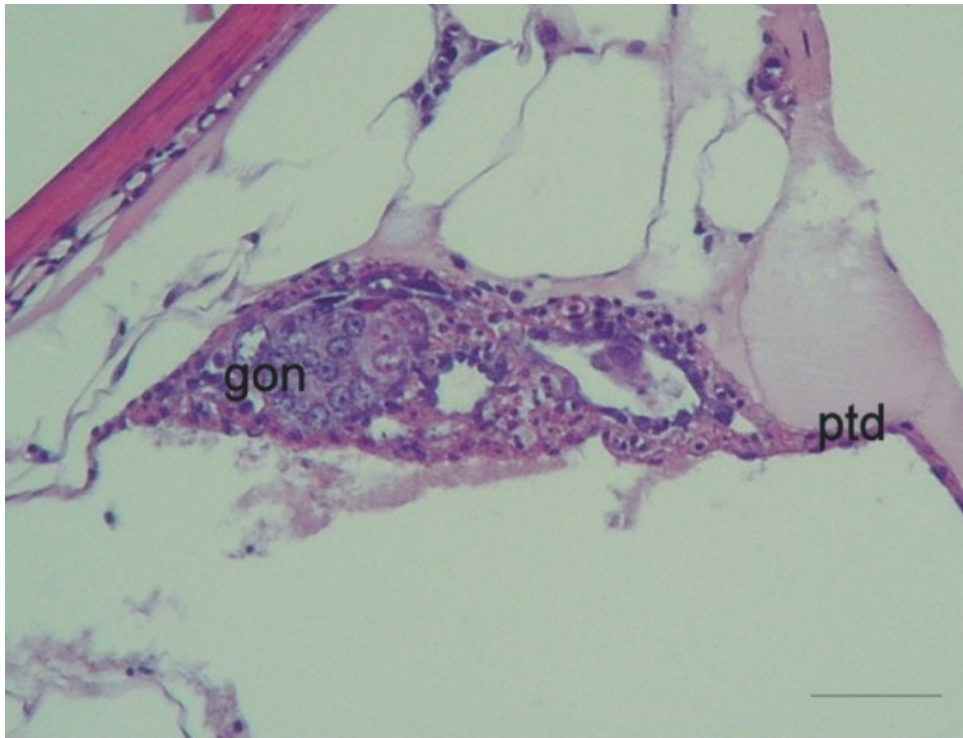


**Abb. 3.33:** Testis aus der LET-Gruppe. Konzentration  $10^{-8}$  M. HE-Färbung.  
sptg = Spermatogonien, sptc = Spermatozyten, sptd = Spermatiden, prt = Peritoneum,  
Balken = 50µm.

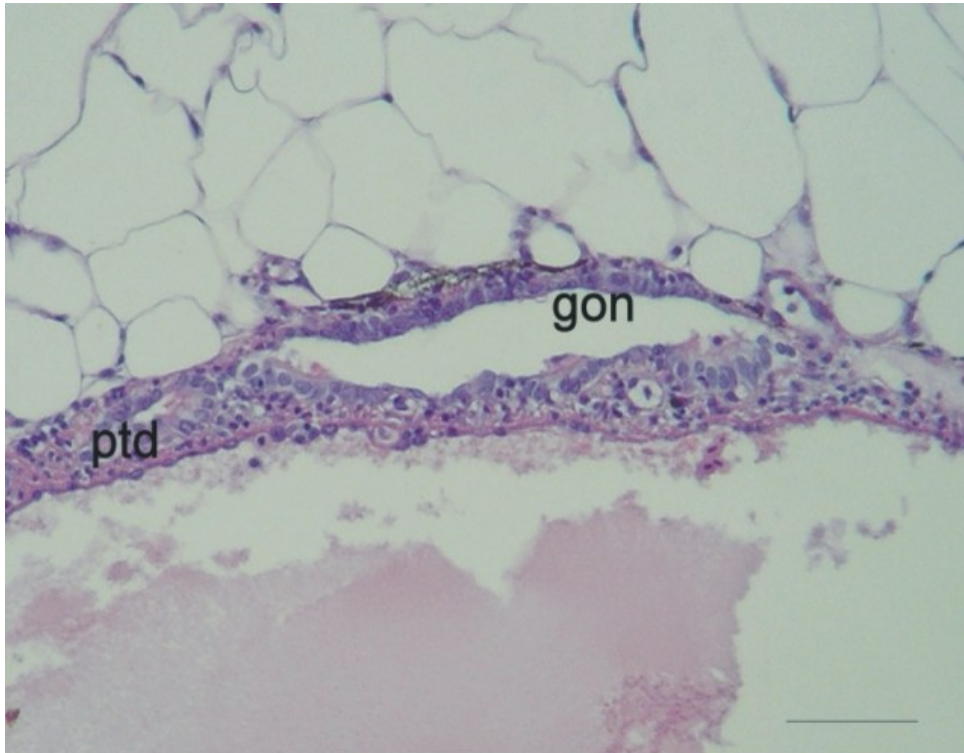


**Abb. 3.34:** Ovar nach der Behandlung mit LET  $10^{-8}$  M. HE-Färbung.  
Oog = Oogonien, vo = vitellogene Oozyten, Balken = 50µm.

MT fuehrte zu einer Supprimierung der Gonadenreife beider Geschlechter gegenueber der SoCo. Außerdem kam es zu einer Peritonealduplikation beider Geschlechter bei einer Konzentration von  $10^{-8}$  M. Daher sind hier die Schnitte aus der Exposition mit der naechst niedrigeren Konzentration,  $0,5 \cdot 10^{-8}$  M, dargestellt. Bei den Maennchen (Abb. 3.35) kam es zu einer rudimentaeren Ausbildung der Gonaden in Peritonealduplikation. Die rudimentaeren Ovarien (Abb. 3.36) zeigten ebenfalls Peritonealduplikationen und ein vermehrtes Auftreten von Primordialzellen.



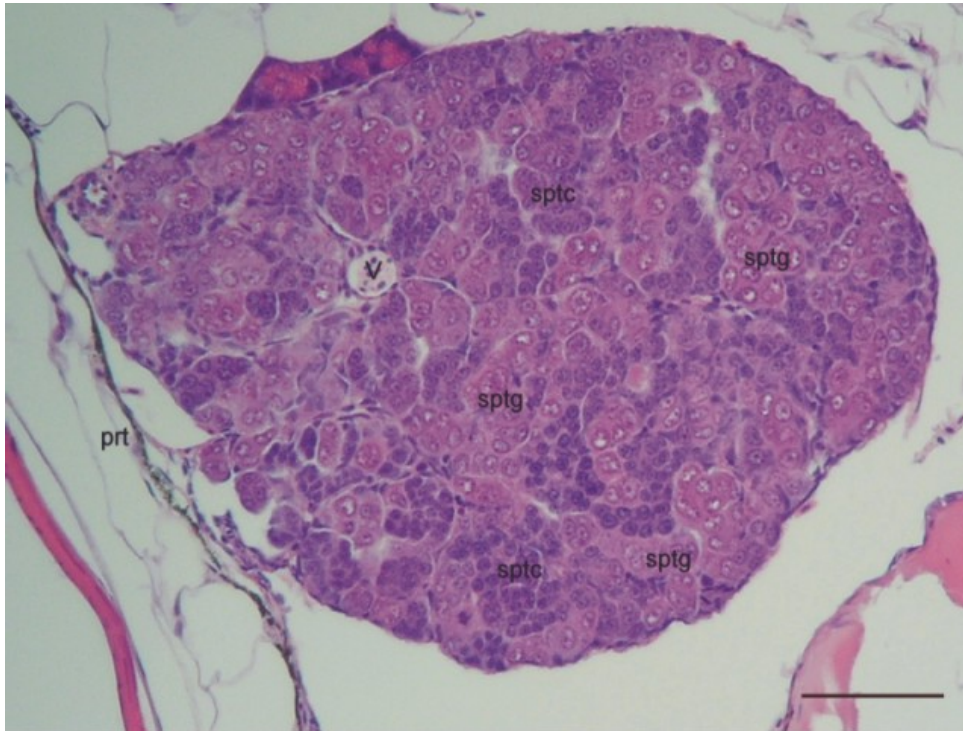
**Abb. 3.35:** Testis der MT-Gruppe. Konzentration  $0,5 \cdot 10^{-8}$  M. HE-Färbung. gon = Gonade, prd = Peritonealduplikation, Balken =  $50\mu\text{m}$ .



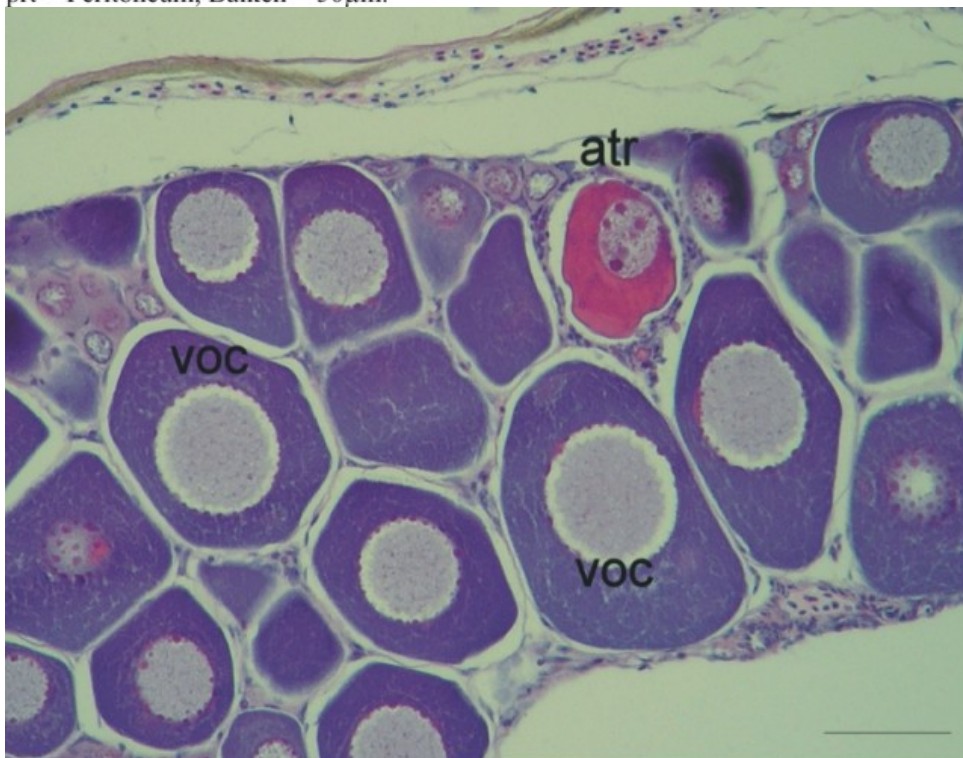
**Abb. 3.36:** Ovar nach der Behandlung mit MT  $0,5 \cdot 10^{-8}$  M. HE-Färbung.  
gon = Gonade, prd = Peritonealduplikation, Balken =  $50\mu\text{m}$ .

Die Exposition mit CYP mit  $10^{-8}$  M führte in den männlichen Gonaden zu einer aktiven aber reduzierten Spermatogenese. Die Reifungsstadien sind nur bis zu Spermatozyten vorhanden, Spermatiden fehlen im Vergleich zur SoCo komplett (Abb. 3.37). Weibliche Tiere bildeten eine aktive Oogenese in den Ovarien mit einzelnen atretischen Oozyten aus (Abb. 3.38).



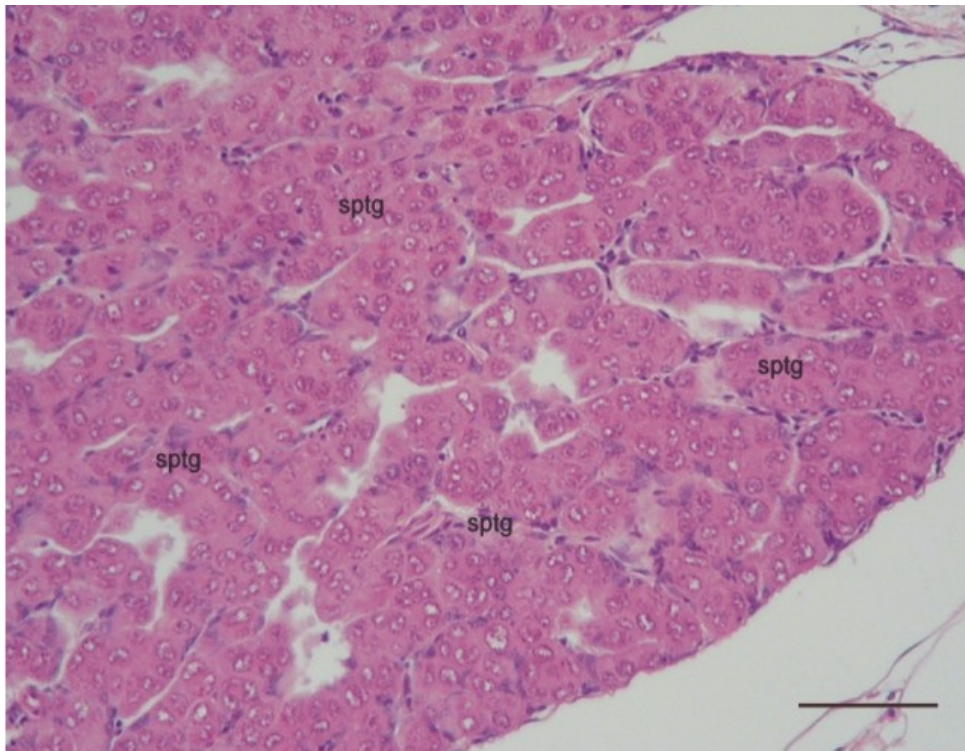


**Abb. 3.37:** Testis der CYP-Gruppe. Konzentration  $10^{-8}$  M. HE-Färbung.  
sptg = Spermatogonien, sptc = Spermatocyten, sptd = Spermatiden, V = Gefäß,  
prt = Peritoneum, Balken =  $50\mu\text{m}$ .

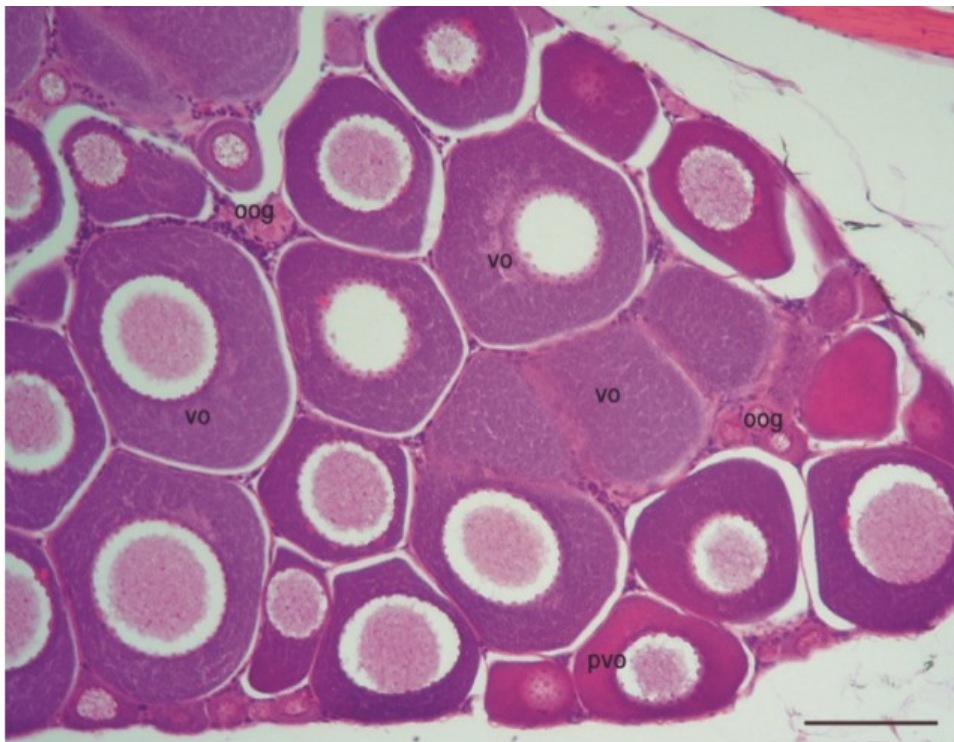


**Abb. 3.38:** Ovar nach der Behandlung mit CYP  $10^{-8}$  M. HE-Färbung.  
atr = atretische Oogonien, voc = vitellogene Oozyten, Balken =  $50\mu\text{m}$ .

Bei FEN  $10^{-8}$  M fand sich in den Testes der Ploetzen nach 210 Tagen eine aktive Spermatogenese mit reduzierter Reifung. Es waren nur Spermatogonien vorhanden (Abb. 3.39). Bei den Weibchen zeigte sich eine normale Reifung der Ovarien mit aktiver Oogenese. Hier waren alle Stadien der Eireife vorhanden (Abb. 3.40).



**Abb. 3.39:** Testis der FEN-Gruppe. Konzentration  $10^{-8}$  M. HE-Färbung. sptg = Spermatogonien, Balken = 50 $\mu$ m.



**Abb. 3.40:** Ovar nach der Behandlung mit FEN  $10^{-8}$  M. HE-Färbung. Oog = Oogonien, Pvo = prävitellogene Oozyten, vo = vitellogene Oozyten, Balken = 50 $\mu$ m.

### 3.3 In vivo Exposition mit adulten *R. rutilus* (EX3)

#### 3.3.1 Mortalitätsraten der in vivo Exposition (EX3)

Die Raten der Mortalität betragen in der EX3:

Tab. 7: Mortalität adulter Plötzen nach vierzehntägiger Exposition (EX3).

Substanz [M]	Mortalitätsrate [%]	Gestorbene Tiere [n]
1) SoCo	0,00	0
2) SoCo	0,00	0
1) TPT $10^{-8}$	0,00	0
2) TPT $10^{-8}$	0,00	0
1) VIN $10^{-8}$	0,00	0
2) VIN $10^{-8}$	0,00	0
1) LET $10^{-8}$	0,00	0
2) LET $10^{-8}$	0,00	0
1) MT $10^{-8}$	0,00	0
2) MT $10^{-8}$	0,00	0

#### 3.3.2 Reverse Transkriptase-Polymerase-Ketten-Reaktion (RT-PCR)

##### 3.3.2.1 Biomarker adulter 2+ *R. rutilus*

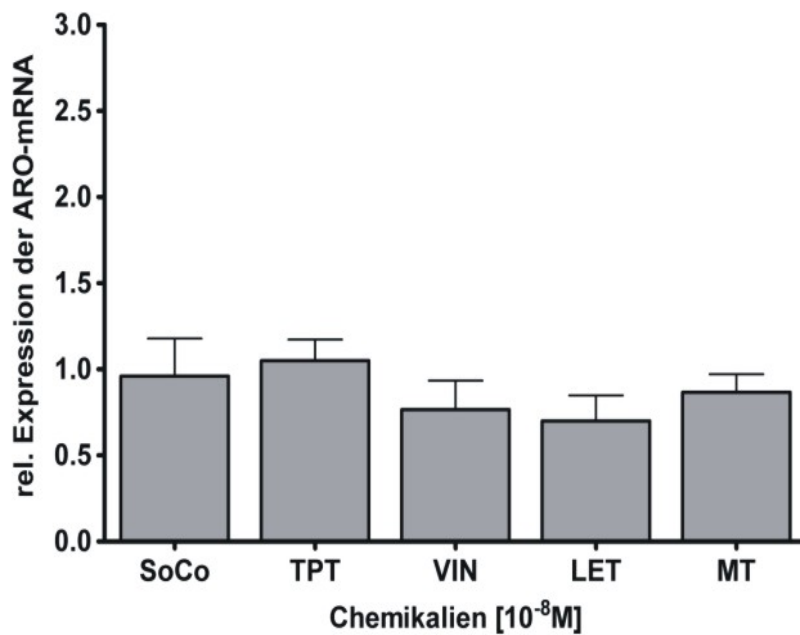
Je sechs Tiere ( $n = 6$ ) pro Behandlungsgruppe und Geschlecht wurden untersucht. Pro Probe wurde eine Doppelbestimmung bei jeder PCR durchgeführt.

##### Aromatase (ARO)-mRNA

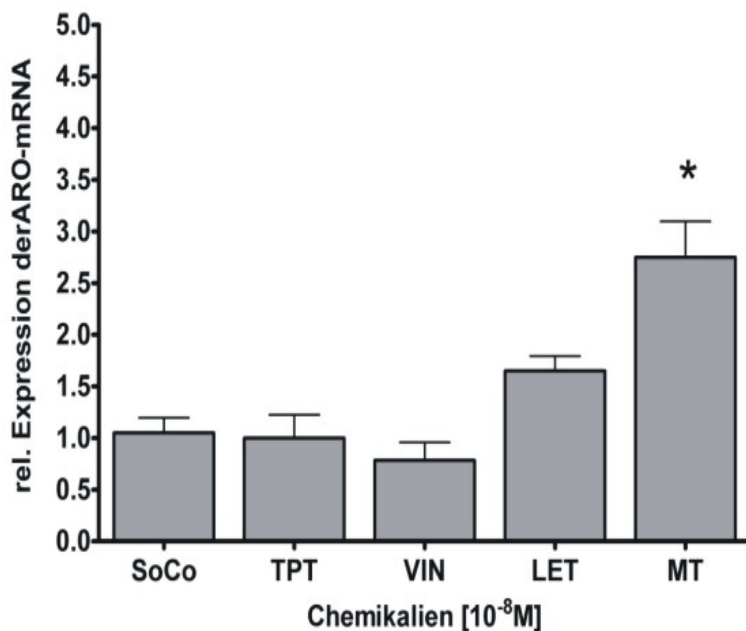
In den Gehirnen der weiblichen 2+ Tieren kam es zu keinen signifikanten Unterschieden der Aromatase-mRNA-Expression nach vierzehntägiger Exposition mit TPT, VIN, LET und MT bei einer Konzentration von  $10^{-8}$  M (Abb. 3.41).

Bei den aus dem gleichen Versuchsansatz stammenden männlichen Tieren zeigte sich, dass MT die Expression von ARO-mRNA signifikant steigerte gegenüber der SoCo (Abb. 3.42).





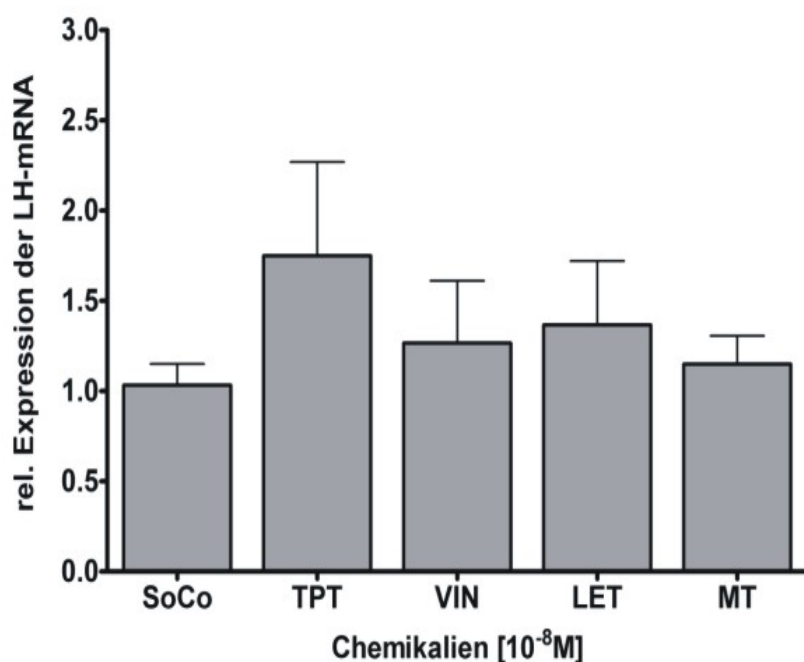
**Abb. 3.41:** Aromatase-mRNA-Expression (Aro-mRNA). Dargestellt ist die relative Expression im Gehirn weiblicher 2+ Plötzen (n=6/Behandlungsgruppe) im Verhältnis zur Lösungsmittelkontrolle (SoCo) nach vierzehntägiger Exposition mit Triphenylzinn (TPT), Vinclozolin (VIN), Letrozol (LET) und Methyltestosteron (MT) bei einer Konzentration von  $10^{-8}$  M.



**Abb. 3.42:** Aromatase-mRNA-Expression (Aro-mRNA). Dargestellt ist die relative Expression im Gehirn männlicher 2+ Plötzen (n=6/Behandlungsgruppe) im Verhältnis zur SoCo nach vierzehntägiger Exposition mit TPT, VIN, LET und MT bei einer Konzentration von  $10^{-8}$  M. Signifikante Unterschiede zur SoCo sind nach dem Dunn's Test mit \* ( $p < 0,05$ ) gekennzeichnet.

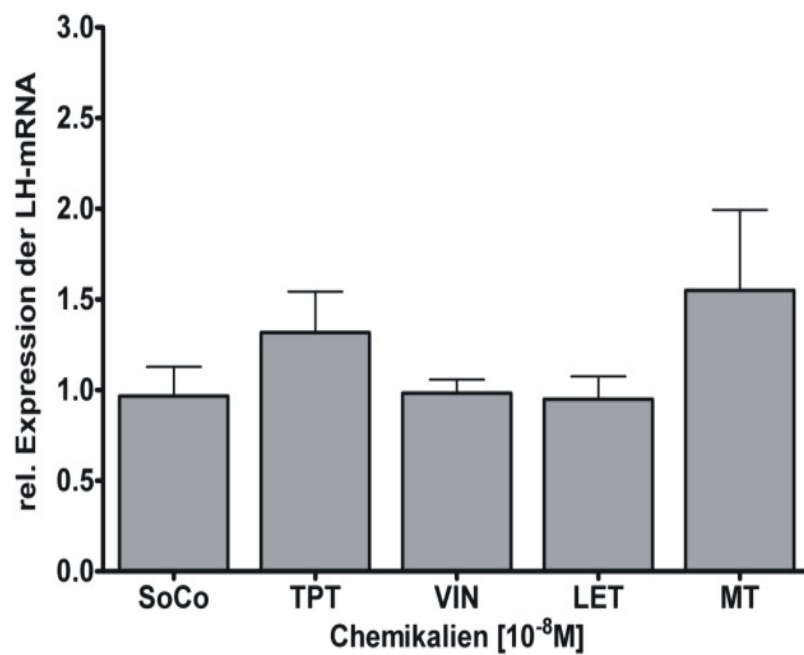
**Luteinisierendes Hormon (LH)-mRNA**

Die Expression der mRNA des LH wurde bei den 2+ Tieren nach vierzehntägiger Exposition mit TPT in den Gehirnen beider Geschlechter untersucht. Obwohl die LH-mRNA in beiden Geschlechtern tendenziell erhöht war, waren weder bei den 2+ Weibchen (Abb. 3.43) noch bei den männlichen 2+ Ploetzen (Abb. 3.44) signifikante Unterschiede zur SoCo auf der zellularen Ebene darstellbar. Alle weiteren Proben waren hinsichtlich des Vergleichs zur SoCo ohne nennenswerten Befund.



**Abb. 3.43:** Luteinisierendes Hormon-mRNA-Expression (LH-mRNA). Dargestellt ist die relative Expression im Gehirn weiblicher 2+ Plötzen ( $n=6/\text{Behandlungsgruppe}$ ) im Verhältnis zur SoCo nach vierzehntägiger Exposition mit TPT, VIN, LET und MT bei einer Konzentration von  $10^{-8}\text{ M}$ .

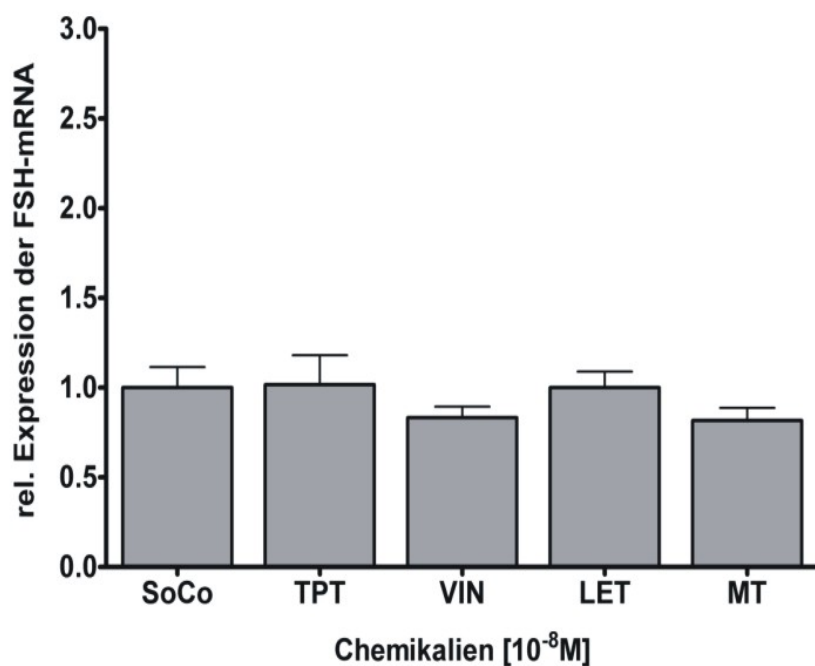




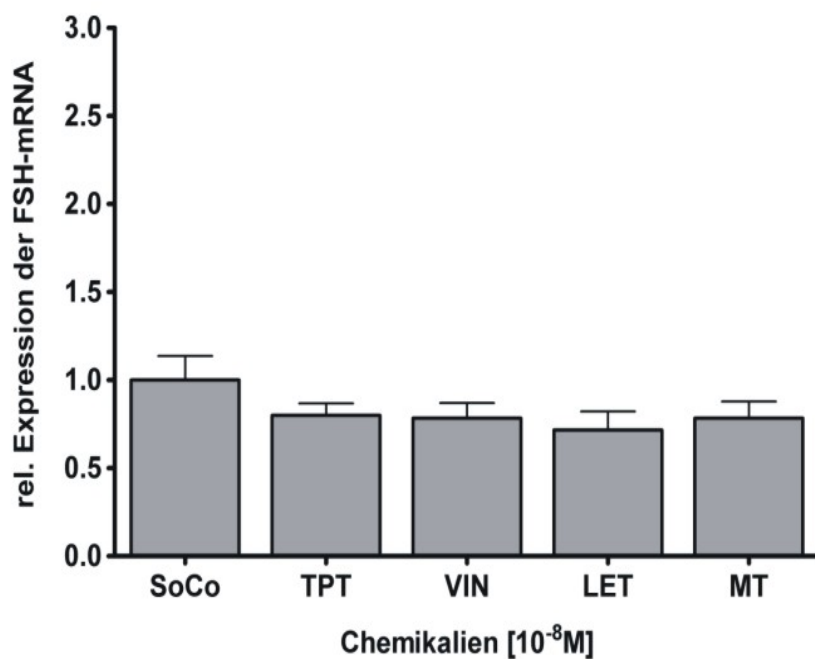
**Abb. 3.44:** Luteinisierendes Hormon-mRNA-Expression (LH-mRNA). Dargestellt ist die relative Expression im Gehirn männlicher 2+ Plötzen (n=6/Behandlungsgruppe) im Verhältnis zur SoCo nach vierzehntägiger Exposition mit TPT, VIN, LET und MT bei einer Konzentration von  $10^{-8}\text{M}$ .

#### **Follikel stimulierendes Hormon (FSH)-mRNA**

Bei der Analyse der FSH-mRNA-Expression zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in allen Proben zur SoCo. Abb. 3.45 zeigt die Ergebnisse für die weiblichen Gehirnproben und Abb. 3.46 die der männlichen 2+ Plötzen.



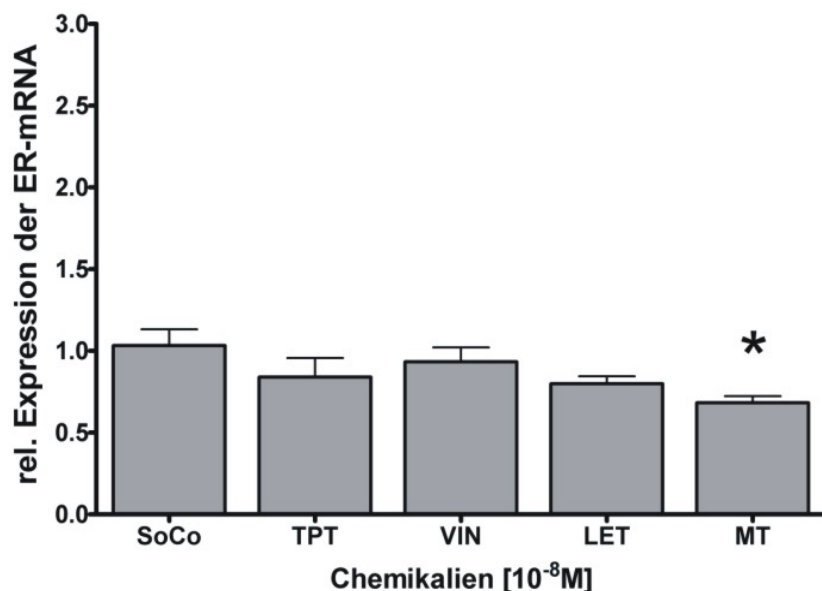
**Abb. 3.45:** Follikel stimulierendes Hormon-mRNA-Expression (FSH-mRNA). Dargestellt ist die relative Expression im Gehirn weiblicher 2+Plötzen (n=6/Behandlungsgruppe) im Verhältnis zur SoCo nach vierzehntägiger Exposition mit TPT, VIN, LET und MT bei einer Konzentration von 10<sup>-8</sup> M.



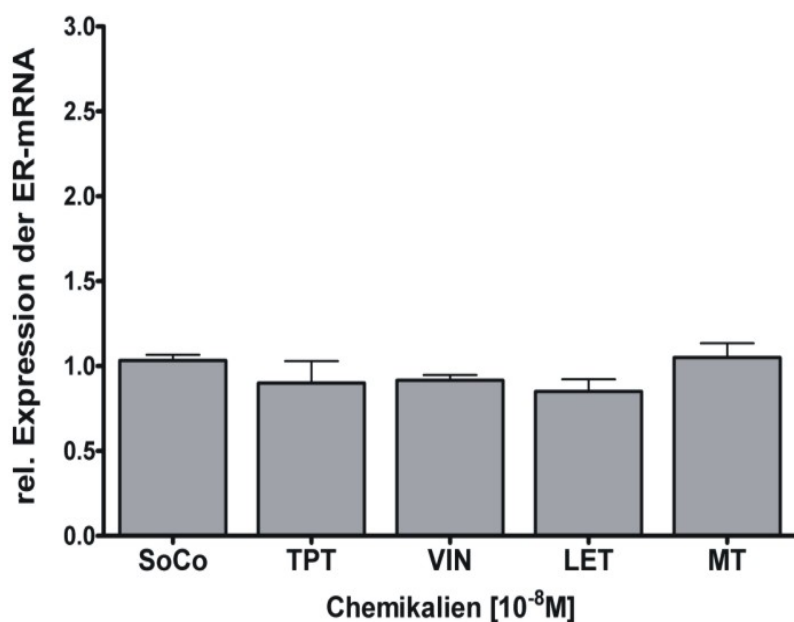
**Abb. 3.46:** Follikel stimulierendes Hormon-mRNA-Expression (FSH-mRNA). Dargestellt ist die relative Expression im Gehirn männlicher 2+Plötzen (n=6/Behandlungsgruppe) im Verhältnis zur SoCo nach vierzehntägiger Exposition mit TPT, VIN, LET und MT bei einer Konzentration von 10<sup>-8</sup> M.

### Oestrogenrezeptor (ER)-mRNA

Die Expression der ER-mRNA wurde in den Gonaden der adulten Tiere gemessen. Zur SoCo zeigte sich bei den mit MT exponierten weiblichen 2+ Tieren eine Abnahme der Expression (Abb. 3.47), die bei den männlichen 2+ Plötzen nicht gefunden wurde (Abb. 3.48).



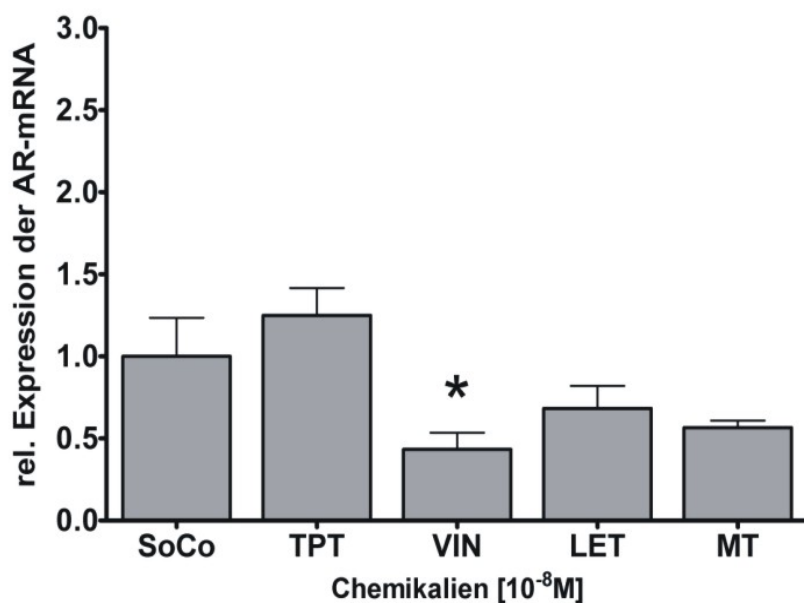
**Abb. 3.47:** Östrogen-Rezeptor-mRNA-Expression (ER-mRNA). Dargestellt ist die relative Expression in den Gonaden weiblicher 2+ Plötzen ( $n=6$ /Behandlungsgruppe) im Verhältnis zur SoCo nach vierzehntägiger Exposition mit TPT, VIN, LET und MT bei einer Konzentration von  $10^{-8}$  M. Signifikante Unterschiede zur SoCo nach dem Dunn's Test sind mit \* ( $p<0,05$ ) gekennzeichnet.



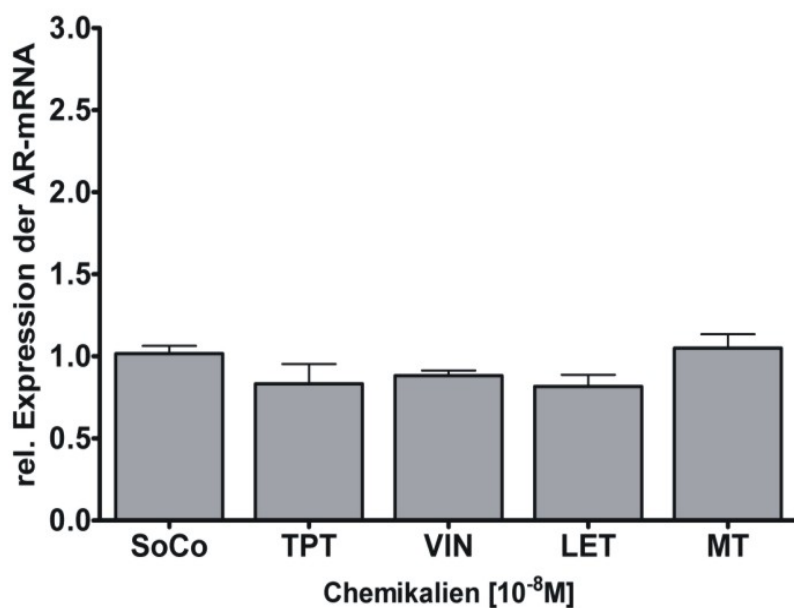
**Abb. 3.48:** Östrogen-Rezeptor-mRNA-Expression (ER-mRNA). Dargestellt ist die relative Expression in den Gonaden männlicher 2+ Plötzen ( $n=6$ /Behandlungsgruppe) im Verhältnis zur SoCo nach vierzehntägiger Exposition mit TPT, VIN, LET und MT bei einer Konzentration von  $10^{-8}$  M.

### Androgenrezeptor (AR)-mRNA

Bei den weiblichen 2+ Plötzen, die nach vierzehntägiger Exposition mit Vinclozolin beprobt wurden, zeigte sich eine deutliche Abnahme im Fall der AR-mRNA in den entnommenen Gonaden (Abb. 3.49). Für die männlichen Tiere traf dies nicht zu (Abb. 3.50).



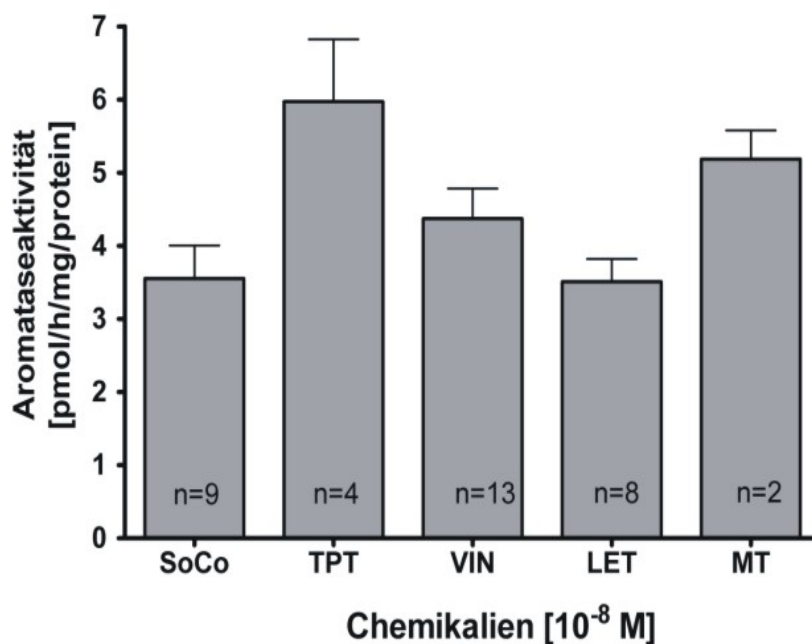
**Abb. 3.49:** Androgen-Rezeptor-mRNA-Expression (AR-mRNA). Dargestellt ist die relative Expression in den Gonaden weiblicher 2+ Plötzen ( $n=6$ /Behandlungsgruppe) im Verhältnis zur SoCo nach vierzehntägiger Exposition mit TPT, VIN, LET und MT bei einer Konzentration von  $10^{-8}$  M. Signifikante Unterschiede zur SoCo wurden nach dem Dunnett's -Test mit \* ( $p < 0,05$ ) gekennzeichnet.



**Abb. 3.50:** Androgen-Rezeptor-mRNA-Expression (AR-mRNA). Dargestellt ist die relative Expression in den Gonaden männlicher 2+ Plötzen ( $n=6$ /Behandlungsgruppe) im Verhältnis zur SoCo nach vierzehntägiger Exposition mit TPT, VIN, LET und MT bei einer Konzentration von  $10^{-8}$  M.

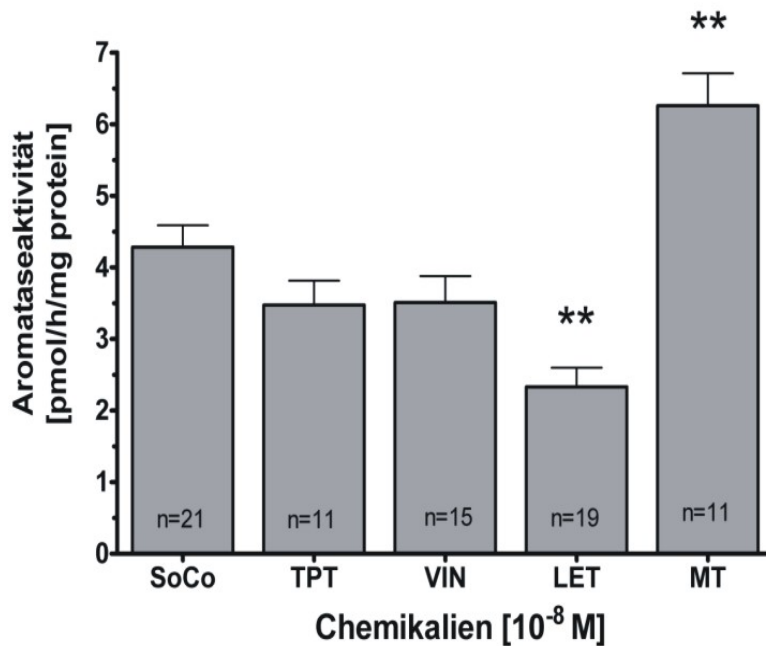
### 3.3.3 Enzymbestimmungen

Bei den Enzymbestimmungen wurden nach vierzehntägiger Exposition von 2+ Plötzen mit TPT, VIN, LET, MT und mitgeführten SoCo in einer Konzentration von  $10^{-8}$  M die Aktivitäten verschiedener Enzyme im Gehirn und in den Gonaden bestimmt. Die Anzahl der Messung zugrunde liegenden Tiere ist in dem jeweiligen Diagrammbalken vermerkt. Signifikante Unterschiede zur Lösungsmittelkontrolle wurden mit Hilfe des Dunnett's-Test statistisch ausgewertet und gekennzeichnet. Aromatase, ein Enzym das T in E2 umwandelt, wurde vergleichend sowohl in weiblichen Gehirnen als auch in Gehirnen männlicher Plötzen untersucht. Die Aktivitäten der Enzyme wurden in pmol/h/mg Protein gemessen und ergaben bei den weiblichen Tieren keine signifikanten Unterschiede zur SoCo (Abb. 3.51).



**Abb. 3.51:** Messung der Aromataseaktivität im Gehirn von weiblichen 2+ Plötzen nach vierzehntägiger Exposition mit Lösungsmittel (SoCo), Triphenylzinn (TPT), Vinclozolin (VIN), Letrozol (LET) und Methyltestosteron (MT) bei einer Konzentration von  $10^{-8}$  M. Die Anzahl (n) der Tiere ist vermerkt.

In den männlichen Tieren hingegen senkte LET die Aromataseaktivität und MT steigerte sie (Abb. 3.52).

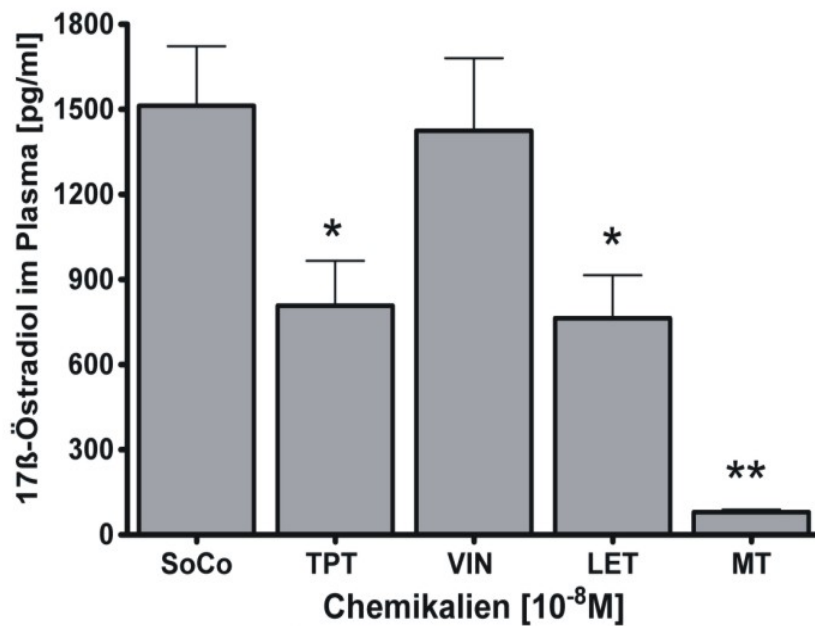


**Abb. 3.52:** Messung der Aromataseaktivität im Gehirn von männlichen 2+ Plötzen nach vierzehntägiger Exposition mit TPT, VIN, LET und MT bei einer Konzentration von  $10^{-8}$  M. Die Anzahl (n) der Tiere ist vermerkt. Signifikante Unterschiede im Vergleich zur SoCo nach dem Dunnett's-Test sind mit \*\* ( $p < 0,01$ ) gekennzeichnet.

Da die Kollegen in der Universitätsklinik Bonn zum Zeitpunkt der Untersuchungen nur die Aromatase-Enzymaktivitäten in den Gehirnen von beiden Geschlechtern bearbeiten konnten, gibt es keine weiteren Ergebnisse zu den Aktivitäten von 17 $\beta$ -Hydroxysteroid-Dehydrogenaseaktivität und 5 $\alpha$ -Reduktase.

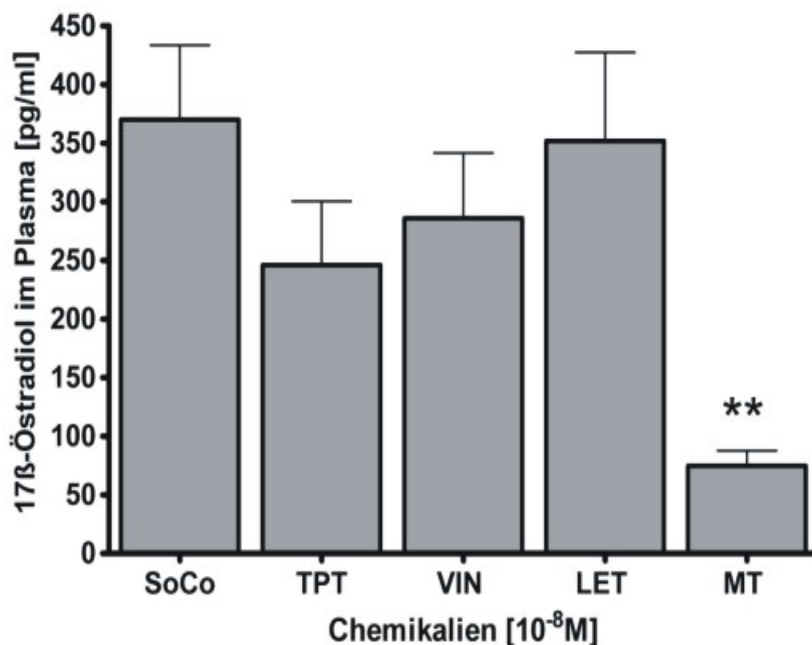
### 3.3.4 Sexualsteroidspiegel im Blut von 2+ *R. rutilus* nach in vivo Kurzzeitexposition mit AACs

Nach vierzehntägiger Exposition (EX3) mit vier verschiedenen Substanzen, TPT, VIN, LET, MT und parallel mitgeführten SoCo bei einer Konzentration von jeweils  $10^{-8}$  M wurden pro Exposition je acht weiblichen (n=8) und acht männlichen (n=8) 2+ Plötzen Blut aus der Caudalvene entnommen und mittels eines Enzym-Immuno-Assays (EIA) die Konzentration an 17 $\beta$ -Oestradiol (E2) und 11-Keto-Testosteron (11-KT) im Blutplasma bestimmt. Hierbei zeigte sich, dass die Konzentrationen von E2 bei den Weibchen gegenüber der Lösungsmittelkontrolle ca. fünffach höher waren als bei den Männchen. Im Vergleich der weiblichen Tiere untereinander hemmten TPT, LET und MT die Konzentrationen von E2 signifikant zur Lösungsmittelkontrolle (Abb. 3.53). Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardfehler.



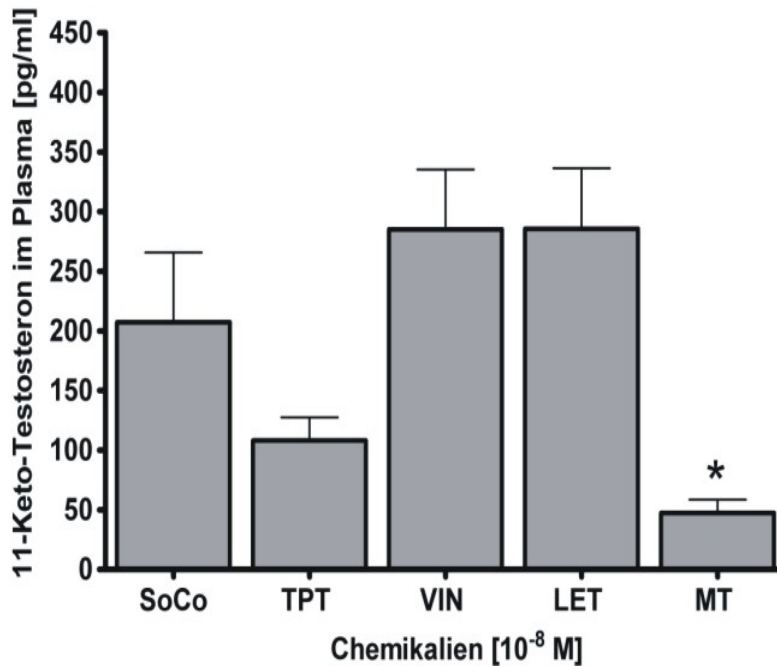
**Abb. 3.53:** 17β-Östradiol im Blutplasma von weiblichen 2+ Plötzen (n=8). Dargestellt sind die Konzentrationen von 17β-Östradiol (E2) nach vierzehntägiger Exposition mit Triphenylzinn (TPT), Vinclozolin (VIN), Letrozol (LET) und Methyltestosteron bei einer Konzentration von  $10^{-8}$  M. Signifikante Unterschiede im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle (SoCo) nach dem Dunnett's -Test sind mit \* ( $p < 0,05$ ) und \*\* ( $p < 0,01$ ) gekennzeichnet.

Bei den Männchen senkte nur MT bei einer Konzentration von  $10^{-8}$  M die im Blutplasma gemessene Menge an E2 signifikant zur Lösungsmittelkontrolle (Abb. 3.54).



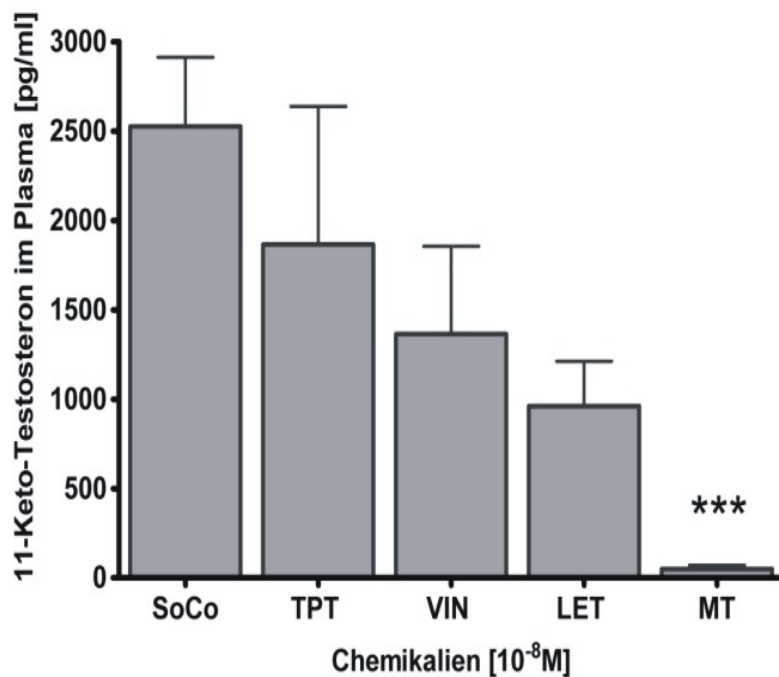
**Abb. 3.54:** E2 im Blutplasma von männlichen 2+ Plötzen (n=8). Dargestellt sind die Konzentrationen von E2 nach vierzehntägiger Exposition mit TPT, VIN, LET und MT bei einer Konzentration von  $10^{-8}$  M. Signifikante Unterschiede im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle (SoCo) nach dem Dunnett's -Test, sind mit \*\* ( $p < 0,01$ ) gekennzeichnet.

Die 11-KT-Spiegel im Blutplasma der männlichen 2+ Tiere aus den SoCo waren nach vierzehntägiger Exposition ca. zwölffach höher als bei den Weibchen. Bei den weiblichen Tieren senkte MT die 11-KT-Konzentration im Blutplasma signifikant zur SoCo (Abb. 3.55). Die Mittelwerte der Konzentrationen von 11-KT im Plasma der MT-behandelten männlichen 2+ Ploetzen waren im Verhältnis zur SoCo signifikant niedriger (Abb. 3.56). Dargestellt sind die Mittelwerte der Ergebnisse aus den EIA von acht Tieren pro Geschlecht und die Standardabweichungen. Signifikante Unterschiede zur SoCo wurden mit dem Dunnett's-Test ermittelt und gekennzeichnet.



**Abb. 3.55:** 11-Keto-Testosteron (11-KT) im Blutplasma von weiblichen 2+ Plötzen (n=8). Dargestellt sind die Konzentrationen von 11-KT nach vierzehntägiger Exposition mit TPT, VIN, LET und MT bei einer Konzentration von  $10^{-8}$  M. Signifikante Unterschiede im Vergleich zur SoCo nach dem Dunnett's -Test sind mit \* ( $p < 0,05$ ) gekennzeichnet.





**Abb. 3.56:** 11-Keto-Testosteron (11-KT) im Blutplasma von männlichen 2+ Plätzen (n=8). Dargestellt sind die Konzentrationen von 11-KT nach vierzehntägiger Exposition mit TPT, VIN, LET und MT bei einer Konzentration von  $10^{-8}$  M. Signifikante Unterschiede im Vergleich zur SoCo nach dem Dunnett's -Test sind mit \*\*\* ( $p < 0,001$ ) gekennzeichnet.

## 4 Diskussion

Zur Bestimmung endokriner Wirkungen von AACs bei *R. rutilus* wurden verschiedene Methoden in vitro und in vivo erstmalig entwickelt, etabliert und angewendet, um potentielle Störungen dieser EDs zu bestimmen. Als AACs wurden verwendet:

Triphenylzinn (TPT) ist eine Substanz, die in Pflanzenschutzmitteln vorkommt und Androgenrezeptor (AR) vermittelte Transkriptionen aktiviert ohne an der Androgenbindungsstelle des Rezeptors zu binden und ohne die Autoinduktion des AR zu behindern (Yamabe et al. 2000). TPT besitzt in Mammalia eine potenziell androgene Wirkung, da durch TPT auch die Aromatase gehemmt wird und somit anstelle von E2 vermehrt Androgene sezerniert werden (Nakanishi et al., 2006).

Methyltestosteron (MT), ein synthetisch hergestelltes Androgen, das durch Alkylierung von Testosteron in der 17 $\alpha$ -Position erzeugt wird, hat eine potenziell androgene Wirkung.

Vinclozolin (VIN), ein Fungizid, zeigte nur eine geringe Affinität zum Androgenrezeptor (AR) beim Menschen (Kelce et al., 1994). Durch Hydrolyse entstehen die beiden Metabolite, M1 und M2, welche als AR-Antagonisten die Transkription androgenabhängiger Gene verhindern (Wong et al., 1995).

Cyproteronazetat (CYP), ein synthetisches Gestagen, das zur Therapie bei Prostatakarzinomen eingesetzt wird, gehört zu der Wirkstoffklasse der Rezeptorblocker, und weist eine potenzielle antiandrogene Wirkung auf.

Letrozol (LET), einem Medikament aus der Brustkrebs-Rezidivprophylaxe, das in Deutschland erst im März 2006 zugelassen wurde, ist ein Aromatasehemmer und somit potenziell androgen.

Fenarimol (FEN), ein Pflanzenschutzmittel, ist ebenfalls ein Aromatasehemmer und somit potenziell androgen.

Zusammengefasst wurden drei Gruppen von AACs eingesetzt.

Die Gruppe mit androgener Wirkung: TPT und MT.

Die Gruppe mit antiandrogener Wirkung: VIN und CYP.

Die Gruppe der Aromatasehemmer, und somit androgener Wirkung: LET und FEN.

### 4.1 Charakterisierung der Bindung (anti)androgener Substanzen (AACs) an die Androgenrezeptoren (AR) mittels Radiorezeptorassay (RARA)

Um festzustellen, ob Umweltchemikalien eine androgene oder antiandrogene Wirkung über die Androgen-Rezeptoren hervorrufen, muss zunächst die Bindungsfähigkeit solcher Substanzen an den Rezeptor gezeigt werden. Die Bindung an einen Rezeptor ruft nicht unbedingt eine biologische Wirkung hervor. Ebenso könnte durch die Bindung an den Rezeptor eine Blockierung der transaktivierenden Funktionen, also ein antagonistischer Effekt, auftreten. Die Bindung an den Rezeptor stellt somit die erste Möglichkeit (anti)androgenen Wirk-

mechanismen dar. Daher ist es von essentieller Bedeutung den Androgenrezeptor bei *R. rutilus* daraufhin zu charakterisieren, was innerhalb dieser Arbeit anhand der Methode des Radiorezeptorassays mit cytosolischen Extrakten der Gonaden und der Leber von *R. rutilus* durchgefuehrt wurde.

#### 4.1.1 Kinetische Experimente

Bisher sind noch keine Untersuchungen zur Charakterisierung der Ligandenbindung an Androgen-Rezeptoren bei *R. rutilus* durchgefuehrt worden. Daher stellen die hier aufgezeigten Befunde die ersten Ergebnisse zur Charakterisierung und Etablierung der Androgen-Rezeptor-Bindung in den Gonaden und der Leber von *R. rutilus* dar. Optimale Inkubationsbedingungen ergaben sich unter der Verwendung von Tris-HCl-Puffer bei einer Temperatur von 4°C wie bei Lutz und Kloas (1999) fuer die Oestrogen-Rezeptor-Bindung bei *Xenopus laevis* beschrieben, was durch eigene Vorversuche bei *R. rutilus* bestaetigt wurde. Durch die Ergebnisse des Zeitverlaufs der Bindung von Testosteron an die Androgen-Rezeptoren zeigte sich, ab welchem Zeitraum sich Testosteron an die Androgen-Rezeptoren spezifisch bindet und ueber welchen Zeitraum die Inkubationsbedingungen die Aufrechterhaltung eines stabilen Gleichgewichtes zwischen Assoziation und Dissoziation (steady state) des Liganden und seines Rezeptors ermoeeglichten. Bis zu 3 Stunden erfolgte ein kontinuierlicher Anstieg der spezifischen Bindung, um dann eine maximale Bindung als steady state zu erreichen, die fuer 21 Stunden stabil blieb, bevor sie wieder abfiel, was optimale Bedingungen fuer Untersuchungen von AACs hinsichtlich ihrer Bindungsfahigkeit an die nukleaeren Androgenrezeptoren bei *R. rutilus* gewaehrleistet.

#### 4.1.2 Konkurrenzexperimente

Die Ergebnisse zur Spezifizierung des Androgen-Rezeptors in der Leber und den Gonaden von *R. rutilus* wurden mit maennlichen und weiblichen Tieren durchgefuehrt. Die Affinitaet der verschiedenen Liganden ergab innerhalb einer Gewebeart keine signifikanten statistischen Unterschiede zwischen Maennchen und Weibchen, weshalb die Ergebnisse zusammengefasst betrachtet werden koennen. Bezueglich der IC<sub>50</sub>-Werte ergab sich fuer die kompetitiven Wirkungen der Liganden und den daraus resultierenden Affinitaeten zum Androgen-Rezeptor in den Gonaden folgende Reihenfolge: MT ≥ T > E2 ≥ CYP. TPT und p,p'-DDE besaßen keine Affinitaet zum Rezeptor. Die IC<sub>50</sub>-Werte zeigen, dass T, der natuerliche Ligand, und MT, ein synthetisch hergestelltes Steroidhormon, die hoechsten Affinitaeten zum Androgen-Rezeptor besitzen. E2, eines der wichtigsten natuerlichen Oestrogene, und CYP weisen eine deutlich geringere Affinitaet zum AR auf als T und MT.

Somit konnte erstmals gezeigt werden, dass der AR eine hohe Spezifitaet fuer seinen natuerlichen Liganden T und das synthetische Androgen MT, besitzt. Die hohe Spezifitaet wurde auch durch die geringe Bindungsaffinitaet der Oestrogene belegt. In einer Studie, die dies ebenfalls belegt, wurden 202 Chemikalien auf ihre Bindung an den Androgenrezeptor von Ratten untersucht (Fang et al. 2003). Hierbei wurde die gleiche Reihenfolge der Bindungsaffinitaet an den AR gefunden wie in der hier vorliegenden Studie. Das p,p'-DDE keine Affinitaet zum AR in den Gonaden von *R. rutilus* zeigt, koennte an der Sensitivitaet des RARAs liegen. Wie Fang et al. zeigten, liegt der IC<sub>50</sub>-Wert fuer p,p'-DDE in der Studie um zwei bis drei Zehnerpotenzen hoeher als der von T oder MT. Obwohl bei *R. rutilus* die eingesetzte Menge an p,p'-DDE hoeher war als die von T oder MT, koennte der Radiorezeptorassay hier nicht mehr sensibel genug gewesen sein. Eine Verdraengung waere bei hoeheren Konzentrationen von p,p'-DDE aber zu erwarten, was aber aufgrund der Loeslichkeit von p,p'-DDE in diesen Assays nicht

mehr durchfuehrbar war. TPT hingegen bindet nicht in der Bindungstasche des AR wie der natuerliche Ligand und zeigt somit keine Affinitaet gegenueber der Bindungsstelle des natuerlichen Liganden (Yamabe et al. 2000). Die gleiche Reihenfolge der Affinitaeten der Liganden und die gleichen Schlussfolgerungen ergaben sich auch bei den Untersuchungen fuer das Bindungsverhalten der AR in der Leber von Maennchen und Weibchen von *R. rutilus*.

Alle hier eingesetzten Substanzen fuehrten zu einer Verdraengung des natuerlichen Liganden am AR außer p,p'-DDE und TPT. p,p'-DDE und TPT zeigten eine geringe oder keine Affinitaet zum AR. Bei p,p'-DDE war die eingesetzte Konzentration zu niedrig und TPT bindet an einer anderen Stelle als der Ligand am Rezeptor. Die charakterisierte AR-Bindung zeigt, dass der AR von *R. rutilus* eine soweit belegte recht aehnliche Spezifitaet wie andere Vertebraten-Modelle aufweist. Hinsichtlich der Wirkungen von AACs stellt *R. rutilus* somit ein gutes vergleichendes Modell dar.

## 4.2 In vivo Expositionen mit larvalen *R. rutilus*

### 4.2.1 Mortalitaet

Die Aufzucht und Exposition in einem semistatischem System von *R. rutilus* vom Eistadium ueber 210 Tage nach der Fertilisation mit AACs wurde im Rahmen dieser Arbeit erstmals durchgefuehrt. Die Mortalitaet betrug bei der ersten Exposition (EX1) in allen Faellen unter 6,6 %. TPT, VIN, und FEN wurden hierbei in vier Konzentrationen ( $0,5 \cdot 10^{-9}$  M,  $10^{-9}$  M,  $0,5 \cdot 10^{-8}$  M und  $10^{-8}$  M) eingesetzt sowie zwei Becken mit Loesungsmittel zur Kontrolle. Eine Ausnahme bildet die Mortalitaetsrate in einem Becken bei einer TPT-Konzentration von  $0,5 \cdot 10^{-8}$  M. Hier starben aus nicht zu klaerenden Ursachen 80,0 % des Beckenbesatzes. Bei der zweiten Exposition (EX2) betrug die Mortalitaet in allen Faellen 0,0 %. Die verwendeten AACs waren hier MT, CYP und LET in den gleichen Konzentrationen wie bei der EX1 ( $0,5 \cdot 10^{-9}$  bis  $10^{-8}$  M). Ebenfalls gab es zwei Loesungsmittelkontrollen (SoCo). Im Vergleich dazu haben Liney et al. (2006) *R. rutilus* nach der Fertilisation ueber 300 Tage in einer Durchflussanlage exponiert, konnten aber nach Abschluss der Exposition keine Aussagen ueber die Mortalitaet treffen. In aehnlichen Studien mit *Danio rerio* betrugen die Mortalitaetsraten 21 % bis 34 % (Nash et al., 2004) bzw. 50 % (Hill and Janz, 2003). Somit ist die Mortalitaetsrate von 0,0 % bis 6,6 % bei *R. rutilus* als sehr gering einzuschaetzen, was auf nahezu optimal entwickelte Haelterungsbedingungen schließen laesst.

### 4.2.2 Gesamtlaenge

Nach 210-taegiger Exposition wurden die Gesamtlaengen der larvalen *R. rutilus* gemessen. Hierbei zeigte sich, dass die Laenge aller Fische der TPT-Expositionen im Mittel signifikant geringer war im Vergleich zur SoCo. Expositionen mit Wasser aus Klaeranlageauslaeufern zeigten keine Unterschiede im Laengenwachstum bei *R. rutilus* (Liney et al. 2006). Da bekannt ist, dass bei TPT der Anteil an Zinn hauptverantwortlich ist fuer die adversen Effekte, wurden von den nominellen Konzentrationen, die hier eingesetzt wurden ( $0,5 \cdot 10^{-9}$  M bis  $10^{-8}$  M), nach der Exposition der Anteil von Zinn in  $\mu\text{g/L}$  Feuchtgewicht bestimmt. In der hier vorliegenden Studie wurden TPT-Sn-Konzentrationen von 60–776  $\mu\text{g/kg}$  Feuchtgewicht gemessen (persoenliche Mitteilung: Thierry Dagnac, BRGM, France). Diese liegen unter denen in der Studie von Harino et al. bei adulten japanischen Barschen gemessenen umweltrelevanten Konzentrationen von 1000–130000  $\mu\text{g/kg}$  Feuchtgewicht (Harino et al.

2000), bei der keine Unterschiede im Laengenwachstum gefunden wurden. So konnte hier erstmals gezeigt werden, dass TPT in geringen umweltrelevanten Konzentrationen bei Larven von *R. rutilus* einen hemmenden Effekt auf das Laengenwachstum hat.

Weiterhin ist bekannt, dass bei *Ambystoma barbouri*, einer Art der Querzahnmolche, die im Süßwasser stattfindende larvale Entwicklung unter Einfluss von TPT in nominellen Konzentrationen von 1 µg/L und 5 µg/L stark beeinträchtigt wurde. Hierbei kam es unter anderem zu einer Dosis abhängigen extremen Reduktion der Koerperlaenge im Vergleich zur Kontrolle (Rehage et al., 2001). Ebenfalls eine Beeinträchtigung der larvalen Entwicklung und Koerpermissbildungen wurden bei der Elritze (*Phoxinus phoxinus*) nachgewiesen (Fent und Meier, 1994). Hierbei wurden die Fische bei 21  C und nominellen Konzentrationen von 3,9 µg/L bis 15,9 µg/L geh  ltet. Effekte, wie Koerpermissbildungen und Mortalitaet, traten bereits nach 3 bzw. 5 Tagen auf. In der vorliegenden Studie wurden die larvalen *R. rutilus* bei 20 ± 1  C und einer nominellen Konzentration von 0,059 µg/L bis 1,187 µg/L TPT exponiert. Diese Konzentrationen liegen unter der Dosis, die Fent und Meier (1994) eingesetzt haben, und bewirkten keine gesteigerte Mortalitaetsrate, hatten aber nach 210 Tagen einen signifikanten Effekt auf die Koerperlaenge der Larven von *R. rutilus* im Vergleich zur Kontrolle. MT, die zweite hier eingesetzte Substanz mit androgener Wirkung, zeigte hingegen keine signifikanten Unterschiede zur SoCo. Dies erklärt sich aus der schlechteren Gesamtentwicklung, auf die spaeter noch eingegangen wird. Beide Antiandrogene, VIN und CYP, zeigten genau wie FEN, ein potentieller Aromatasehemmer, keine Auswirkung auf das Laengenwachstum der Larven von *R. rutilus*. Letrozol, ein weiterer potentieller Aromatasehemmer, bewirkte in der niedrigsten Konzentration, dass die Koerperlaenge im Vergleich zur SoCo signifikant hoeher war. Bei einer umfangreichen Studie mit Japanischen Reiskaerpflingen (*Oryzias latipes*) wurden befruchtete Eier und Larven fuer 14 Tage bei einer maximalen Konzentration von 3125 µg/L Letrozol exponiert. Es zeigten sich allerdings keinerlei Effekte auf die Morphologie (Shuna et al. 2007). Da es sich bei der Exposition von *R. rutilus* mit Letrozol um die erste Studie ueberhaupt handelt, die ueber einen Zeitraum der gesamten Geschlechtsdifferenzierung durchgefuehrt wurde, ist festzustellen, dass Letrozol in einer Konzentration von 713 µg/L eine signifikante Steigerung der Koerperlaenge hervorgerufen hat, was auf Effekte auf die Wachstumsregulation schließen laesst.

#### 4.2.3 Gewicht

Der signifikante Unterschied im Gewicht von *R. rutilus* bei der niedrigsten TPT-Konzentration im Vergleich zur Loesungsmittelkontrolle ist konform mit der niedrigeren Koerperlaenge. Genauso wie das hoehere Gewicht bei der niedrigsten Letrozol-Konzentration mit der Zunahme der Koerperlaenge.

Die signifikante Zunahme des Gewichtes bei einer Vinclozolin-Konzentration und zweier Fenarimol-Konzentrationen sind weder Dosis abhängig noch durch einen anderen Einfluss zu erklären und repräsentieren daher wohl eher die zufällig auftretende biologische Variabilität bei *R. rutilus*.

#### 4.2.4 Geschlechtsdifferenzierung

MT und TPT sind androgen wirksame Substanzen. Ueber die Auswirkungen von TPT auf das Geschlechterverhaeltnis bei Süßwasserfischen ist bis dato nichts bekannt. In Konzentrationen von 38,5 µg/L zeigte sich bei Vorversuchen, dass TPT nach nur 48 h zu 100 % letal auf die Larven von *R. rutilus* wirkte (van Ballegooy, unveroeffentlicht). Daher wurde in der EX1 als hoechste Konzentration eine Zehnerpotenz niedriger gewaehlt als

in den Vorversuchen. Die Fische konnten so ueber einen Zeitraum von 210 Tagen exponiert werden, zeigten aber keine Unterschiede zur SoCo hinsichtlich der Sexualdifferenzierung der Geschlechter.

TPT fuehrt in Gastropoden zur Vermaennlichung (Horiguchi, 2006). Bei Fischen wurde gezeigt, dass es zu einer Akkumulation von TPT in verschiedenen Geweben kommt. Dies ergaben Auswertungen von Proben diverser Suezwasserfische aus verschiedenen Fluessen und Seen in Deutschland zwischen 1988 und 2003 (Rudel et al., 2007). Allerdings hat die Exposition von larvalen *R. rutilus* mit hoeheren Konzentrationen letale Folgen, so dass TPT wohl hinsichtlich der Geschlechtsdifferenzierung eher toxisch als endokrin wirksam ist.

Von MT hingegen ist bekannt, dass dieses kuenstliche Androgen zu einer Vermaennlichung bei verschiedenen Tierarten - Invertebraten, Amphibien und Fischen - fuehren kann (Schulte-Oehlmann et al., 2000; Boegi et al., 2002; Seki et al. 2004). Bei den in dieser Arbeit eingesetzten niedrigsten Konzentration von MT (0,151 µg/L) kam es zu einer signifikanten Verschiebung des Phaenotypes in Richtung Maennchen. Bei den progynen Zebrafischen (*Danio rerio*) kam es in einem „partial life-cycle test“ bei jeder der verwendeten Konzentrationen (26-1000 µg/L) zu einer totalen Vermaennlichung der eingesetzten juvenilen Tiere (Orn et al., 2003). In einer Studie mit Reiskaerpflingen (*Oryzias latipes*) kam es durch Injektion von MT zu einer phaenotypischen maennlichen Ausbildung von genotypischen Weibchen (Papoulias et al., 2000). Die beiden hoechsten Konzentrationen (1,51 bzw. 3,02 µg/L) fuehrten dazu, dass die larvalen *R. rutilus* keine Gonaden ausbildeten. Dieser Effekt ist bei Fischen bisher noch nicht beschrieben worden.

Die potentiell antiandrogen wirksamen Substanzen VIN und CYP zeigten keine Einfluesse auf die Geschlechtsdifferenzierung bei larvalen *R. rutilus* in den eingesetzten Konzentrationen. VIN verursachte in einem anderen Versuch ueber 100 Tage nach dem Schluepfen bei einer Konzentration von 2500 µg/L keine Effekte auf die Geschlechtsdifferenzierung bei Japanischen Reiskaerpflingen (*Oryzias latipes*). Das Gleiche galt auch fuer CYP bei einer eingesetzten Konzentration von 10 µg/L (Kiparissis et al., 2003). Alle bei EX1 und EX2 mit *R. rutilus* eingesetzten Konzentrationen lagen deutlich unterhalb der von Kiparissis gewaehlten Konzentration, so dass sich auch hier kein Einfluss durch VIN und CYP auf die Geschlechterverteilung festzustellen war.

In dieser Arbeit zeigten die beiden eingesetzten Aromatasehemmer FEN und LET keine Effekte auf das Geschlechterverhaeltnis bei larvalen *R. rutilus* im Verhaeltnis zur SoCo. Dies laesst den Rueckschluss zu, dass die hoechsten gewaehlten Konzentrationen von 2,83 µg/L (LET) bzw. 3,31 µg/L (FEN) unterhalb der effektiven Konzentrationen liegen und ueber den Expositionszeitraum von 210 Tage nach dem Schluepfen der Fische keine direkte Auswirkung auf die Geschlechtsdifferenzierung bei larvalen *R. rutilus* haben. Bei hoeheren Konzentrationen waere eventuell bei *R. rutilus* mit einer Verschiebung des Geschlechterverhaeltnisses in Richtung der Maennchen zu rechnen. So fuehrte eine Konzentration von 500 µg/g Futter/Tag eines zur Therapie bei Mammakarzinomen eingesetzten Aromatasehemmers, Fadrozol, bei Zebrafischen (*Danio rerio*) zu einer 100%igen Vermaennlichung (Fenske und Segner, 2004). In der Japanischen Flunder (*Paralichthys olivaceus*) kam es durch die taegliche Fuetterung von larvalen Fischen mit Fadrozol in einer Konzentration von 100 µg/g Futter/d vom dreißigsten bis zum 100sten Tag nach dem Schluepfen bei 100 % der genetisch weiblichen Fische zur Entwicklung von maennlichen Gonaden. Bei der niedrigsten Konzentration, 1 µg/g Futter/Tag, belief sich der Anteil der vermaennlichten Tiere nur noch auf 30% (Kitano et al., 2000).

#### 4.2.5 Genexpressionen der Biomarker bei den larvalen *R. rutilus*

Um die Wirkung von AACs auf der Ebene der Genexpression nachzuweisen und um den Einfluss weiterer Faktoren, wie sie im Gesamtorganismus vorhanden sind, auszuschließen, wurde die Methode der semiquantitativen Reverse-Transkriptase-Polymerase-Ketten-Reaktion (RT-PCR) bei den Zielorganen Gehirn und Leber durchgeführt. Hierbei wurde die Expression der mRNA in verschiedenen Geweben nachgewiesen. Im Gehirn wurde die mRNA-Expression von ARO, LH und FSH bestimmt. In der Leber von *R. rutilus* wurde die Expression der mRNA des ER und des AR detektiert. Um eine semiquantitative Bestimmung der jeweiligen mRNA zu ermöglichen, wurde parallel das „housekeeping gene“ EF 1 $\alpha$  nachgewiesen. Erstmals wurde in dieser Arbeit die Expression der LH-mRNA und FSH-mRNA detektiert. Hierzu wurden für beide Biomarker neue Primer gestaltet und etabliert. Für den Primer der LH-mRNA wurde vor der Erstellung der Arbeit Sequenzen von Carter et al. (2005) veröffentlicht. Diese wurden zunächst verwendet. Allerdings sind die veröffentlichten Primersequenzen fehlerhaft und daher für die Detektion der LH-mRNA nicht geeignet.

Die im Gehirn der larvalen *R. rutilus* gemessenen Ergebnisse zeigten bei allen eingesetzten AACs keine signifikanten Unterschiede in der LH-mRNA-Expression und in der FSH-mRNA-Expression im Vergleich zur Kontrolle. In der Literatur ist beschrieben, dass Aromatasehemmer in Fischen zu einem Anstieg der LH-mRNA im Gehirn und zu einer geringen bis zu keiner Regulation der FSH-mRNA-Expression führen (Sohn et al., 1998; Mateos et al., 2002). Dies deutet darauf hin, dass LH auch während der Ontogenese bei *R. rutilus* eine Schlüsselrolle in der Sexualdifferenzierung spielen könnte und durch exogene Substanzen dahingehend beeinflusst werden kann, dass es zu einer Verweiblichung bzw. zur Hemmung der Gonadenentwicklung kommt. Durch die Testosteronerhöhung im Gehirn der Männchen kommt es sehr wahrscheinlich zu einer negativen Rückkopplung über die Androgene und somit zu einer Gegenregulation, die zu einer Erhöhung der LH-mRNA-Expression führt. Weiterhin kann durch die tendenzielle Erhöhung der LH-mRNA-Expression in manchen Behandlungsgruppen dieser Studie bestätigt werden, dass FSH weniger stark reguliert ist wie LH. Würde man die mRNA-Expressionen nicht wie hier aus dem Gesamthirn messen sondern beispielsweise lokal in der Hypophyse, könnten gegebenenfalls tendenzielle Änderungen sich signifikant darstellen.

Bei den hier verwendeten männlichen *R. rutilus* stieg die ARO-mRNA-Expression in der mit 0,151  $\mu\text{g/L}$  MT behandelten Tiere in den Gehirnen signifikant um das ca. 4,5-fache im Vergleich zu den Tieren aus der SoCo. Die ARO-mRNA-Expression im Gehirn steht im direkten Zusammenhang mit der gonadalen Sexualdifferenzierung. Viele verschiedene Pestizide und Chemikalien, die weltweit im Gebrauch sind, haben in vitro Effekte auf die Aromataseaktivität in verschiedenen Gruppen der Vertebraten (z.B. Mason et al., 1987; Vinggaard et al., 2000; Sanderson et al., 2002; Zarn et al., 2003; Heneweir et al., 2004) und Invertebraten (Janer et al., 2006; Duft et al., 2007) gezeigt. Die Hemmung des Enzyms ARO, das maßgeblich an der Umwandlung von T in E2 beteiligt ist, kann zu einer Verweiblichung führen. Allerdings wurde auch eine 100 %ige Verweiblichung von protogynen Zebrafischen (*Danio rerio*) bei einer Exposition mit 10  $\mu\text{g/L}$  MT beobachtet. Dies ging einher mit dem Anstieg der ARO-mRNA-Expression im Gehirn (Fenske und Segner, 2004). Im Gegensatz zu den Zebrafischen kam es hier bei den gonochoristischen *R. rutilus* zu einer signifikanten phänotypischen Verweiblichung während der gonadalen Entwicklung. Im Gehirn der männlichen Tiere führt MT voraussichtlich zu einer Gegenregulation. Um dem hohen Anteil an Androgenen gegenzusteuern, kommt es zu einer vermehrten ARO-

Synthetisierung. Im weiblichen Gehirn hat der Effekt, der von der erhöhten MT-Konzentration ausgelöst wurde, durch die natürlich vorkommende hohe Konzentration von E2 keine Auswirkungen auf die Aromatasesynthese. Genau wie bei dem Zebrafisch zeigt das Ergebnis, dass das exogene Androgen MT in den Prozeß der Aromatasesynthese im Gehirn bei *R. rutilus* drastisch eingreift.

TPT und alle anderen eingesetzten AACs hatten keinen Einfluss auf die Genexpression der Aromatase-m-RNA-Expression. Allerdings wurde eine Inhibierung der Expression durch den Aromatasehemmer LET erwartet. Tendenziell ist dies auch in den Gehirnen männlicher Tiere aufgetreten ohne aber signifikant zu sein. Bei höheren Konzentrationen wäre dies eventuell der Fall gewesen.

Um die Auswirkungen der eingesetzten AACs auf Zielorgane des endokrinen Systems bei *R. rutilus* und um die mit dem RARA gewonnenen Ergebnisse auf ein weiteres endokrines Zielorgan zu untersuchen, wurden die Genexpressionen der ER-mRNA und AR-mRNA in der Leber detektiert. Hierbei zeigte sich, dass TPT die ER-mRNA-Expression in den Weibchen stark hemmt. Da die hier eingesetzte Konzentration um nur eine Zehnerpotenz niedriger war als die letale Dosis aus den Vorversuchen, scheint es sich hier um einen toxischen Effekt zu handeln, der nicht letal wirkt dafür aber die Autoinduktion der ER-mRNA-Expression bzw. generell jede Genexpression inhibiert. Dies wird auch durch die Ergebnisse der AR-mRNA unterstützt, die in beiden Geschlechtern von *R. rutilus* eine Abnahme der Expression aufweist.

Das Androgen MT steigert die AR-mRNA-Expression in der Leber beider Geschlechter signifikant. Da MT einen erhöhten Androgenspiegel induziert, liegt hier die Vermutung nahe, dass es sich um eine Autoinduktion handelt.

CYP reguliert in der Leber der weiblichen und männlichen Tiere als potenziell antiandrogene Substanz die Expression der AR-mRNA signifikant nach oben im Vergleich zur SoCo. Genauso wie VIN, ebenfalls mit potenzieller antiandrogener Wirkung, in der Leber der Männchen. Diese Ergebnisse legen nahe, dass durch die Blockierung der AR es zu einer Zunahme der Expression der AR kommt, um dadurch wieder funktionelle AR zur Verfügung zu haben. Der Mechanismus, dem eine solche Regulation zugrunde liegt, ist noch unklar, muss aber unabhängig von der oben beschriebenen Autoinduktion des AR durch Androgene sein. Der potentielle Aromatasehemmer LET erhöht die AR-mRNA-Expression in der Leber von *R. rutilus* bei beiden Geschlechtern signifikant. Hier dürfte es sich um eine Autoinduktion des AR durch die Erhöhung der Androgenkonzentration handeln.

#### 4.2.6 Histologie

Neben den morphologischen, biochemischen und molekularbiologischen Endpunkten, wurden die Gonaden histologisch untersucht. Hierbei riefen die verschiedenen eingesetzten Substanzen adverse Effekte in den Gonaden von *R. rutilus* hervor. War zunächst bekannt, dass vermutlich EDs in den Gonaden von wild lebenden adulten *R. rutilus* zu Missentwicklungen, Intersex und zur Minderung der Fertilität führen (Jobling et al., 2002), wurde später gezeigt, dass auch larvale *R. rutilus*, die über einen Zeitraum von 300 Tagen nach der Befruchtung exponiert wurden, adverse Effekte in der Gonadenentwicklung aufwiesen (Liney et al., 2005, 2006). Bei diesen Untersuchungen handelte es sich vorwiegend um die Exposition mit Kläranlagenausläufen. Dabei wurde der Fokus hauptsächlich auf oestrogen wirksame Substanzen gelenkt.



In der hier vorliegenden Arbeit wurde erstmals gezeigt, dass AACs die Gametogenese bei larvalen *R. rutilus* stark beeinträchtigen. So zeigten die männlichen Tiere nach einer Expositionszeit von 210 Tagen post Fertilisation mit TPT, eine aktive Spermatogenese, die aber mit Lakunenbildung einherging und in der nur Spermatogonien und keine weiterführenden Reifestadien wie in den Lösungsmittel-Kontrolltieren vorhanden waren. Weiterhin waren Reife und Größe der Testes im Verhältnis zu den Männchen der SoCo reduziert. Hier liegt eine Hemmung der Gonadenentwicklung vor, die sich vermutlich durch die nahe an der Toxizitätsgrenze liegenden Konzentration von  $10^{-8}$  M erklären lässt. Die Weibchen weisen eine aktive Oogenese auf, zeigten aber einzelne atretische Oocyten sowie lokale Resorption von Oogonien auf. Dass der Effekt von TPT, einer androgen wirksamen Substanz (Fang et al., 2003), stärker auf die männlichen Tiere als auf die weiblichen Tiere wirkte, war zu erwarten. Der Wirkmechanismus könnte die Hemmung der Glucuronidierung von T in Fischen durch TPT sein (Lavado et al., 2004) oder die von Säugetieren und Mollusken bekannte Wirkung als Aromatasehemmer (Naganishi et al., 2006; Duft et al., 2007).

Bei den *R. rutilus*, die über 210 Tage mit MT in Konzentrationen von 1,51 µg/L bzw. 3,02 µg/L exponiert wurden, war die gonadale Entwicklung beider Geschlechter zu 100 % supprimiert, so dass eine histologische Auswertung nicht möglich war. Bei einer Konzentration von 0,3 µg/L MT waren 6,3 % der männlichen Gonaden nur rudimentär ausgebildet und bei den Ovarien kam es bei 6,3 % der Tiere zu Atresien in den Gonaden. Auch bei *Pimephales promelas* wurde nach einer dreiwöchigen Exposition mit MT in einer Konzentration von 0,1 µg/L bei 5 % der weiblichen Tiere Atresien in den Ovarien detektiert. Bei einer Konzentration von 50 µg/L lag die Rate der Atresien schon bei 11,4 %. Allerdings waren die Fische zum Zeitpunkt der Exposition bereits 10 bis 15 Monate alt (Pawlowski et al., 2004). Dies ist auch der entscheidende Unterschied zu der hier vorgestellten Studie mit *R. rutilus*, was darauf hindeutet, dass eine Exposition mit dem Androgen MT in der frühen Ontogenese extrem adverse Effekte auf die Gametogenese bewirkt und sogar zu einer vollständigen Supprimierung der Gonadenausbildung führen kann.

Bei VIN zeigte sich bei den männlichen und weiblichen Tieren ein ähnliches Bild wie bei TPT. Auch hier waren die Testes in Reife und Größe reduziert und es zeigten sich nur Spermatogonien nach 210 Tagen Exposition. Die Ovarien der weiblichen Fische hatten ein histologisch unauffälliges Bild. Bis zu dieser Arbeit wurde die hemmende Wirkung von VIN auf die Spermatogenese in larvalen Fischen mit der sehr hohen und nicht umweltrelevanten Konzentration von 2500 µg/L bei Reiskarpfingen (*Oryzias latipes*) über einen Expositionszeitraum von drei Monaten nach dem Schlüpfen gezeigt (Kiparissis et al., 2003). In dieser Arbeit wurde als höchste Konzentration 2,86 µg/L VIN eingesetzt und es zeigten sich mit dieser nahezu 1000fach niedrigeren Konzentration die gleichen Effekte wie bei *O. latipes*. Entscheidende Unterschiede sind die längere Expositionszeit und die Tatsache, dass die Exposition bereits einen Tag nach der Fertilisation begann. Dies deutet, wie schon die molekularbiologischen Untersuchungen, darauf hin, dass die ersten Tage eine entscheidende Rolle in der Gametogenese spielen und es hier durch AACs zu adversen Störungen der Gametogenese kommen kann.

Bei den männlichen Tieren von *R. rutilus*, die mit CYP bei einer maximalen Konzentration von 4,16 µg/L exponiert wurden, zeigte sich, dass es zu einer Reduzierung der Spermatogenese kam. Diese Ergebnisse gehen konform mit denen, die bei *O. latipes* gefunden wurden (Kiparissis et al., 2003). Auch hier kam es bei einer Exposition über 90 Tage mit CYP bei einer Konzentration von 10 µg/L bei 18% der exponierten Tiere zu testikulären Effekten. Bei *R. rutilus* lag der Anteil der rudimentären männlichen Gonaden bei 6,3 %. Auch die

Befunde der weiblichen Gonaden fanden sich bei *O. latipes* ebenso wie bei *R. rutilus*. Es traten im Vergleich zur SoCo keine nennenswerten Unterschiede in der Reife der Ovarien auf. Die Oogenese wurde durch CYP in keiner der verwendeten Konzentrationen sichtlich beeinflusst. Vereinzelt auftretende Atresien in den weiblichen Gonaden sind als Artefakte anzusehen.

LET, ein Aromatasehemmer, wurde in dieser Studie erstmals auf Wirkungen auf die Entwicklung der Gonaden bei Fischen untersucht. Rein histologisch entwickelten sich die männlichen sowie die weiblichen Gonaden nach 210 Tagen Exposition mit Fenarimol ( $0,5 \cdot 10^{-9}$  M bis  $10^{-8}$  M) bis zum Vergleich mit den Tieren der SoCo ohne jede Beeinflussung. Das gleiche gilt auch für den anderen in dieser Studie untersuchten Aromatasehemmer, FEN, bei Konzentrationen von  $0,5 \cdot 10^{-9}$  M bis  $10^{-8}$  M. Auch hier bildeten sich die Gonaden beider Geschlechter im Vergleich zur SoCo normal aus.

TPT, MT, CYP und VIN wirkten sich also negativ auf die Gametogenese aus und deuten somit darauf, dass in den frühen Stadien der Ontogenese Androgene ebenso eine entscheidende Rolle für die Entwicklung der Gonaden spielen wie sie bisher vor allen den Oestrogenen zugeschrieben wurde. Ein Eingreifen durch AACs in die Gametogenese führt ebenfalls zu fundamentalen adversen Schäden bei *R. rutilus*, die die Fortpflanzung einer Population stark einschränken oder gar unmöglich machen. Deuteten die bisherigen Untersuchungen dieser Arbeit darauf hin, dass alle eingesetzten AACs verschiedene, molekulare Biomarker beeinflussen und die normale Entwicklung der Tiere stören können, bestätigt die Histologie dies für vier der Substanzen sehr deutlich. Es ist daher unerlässlich Versuche zu endokriner Beeinflussung der Reproduktion mit histologischen Untersuchungen zu verifizieren.

Zusammenfassend zeigte sich bei den larvalen Tieren, dass TPT zu einer Hemmung des Wachstums führte, die die mRNA-Expression der Gonadotropine nicht nachweisbar beeinträchtigte, in der Leber die mRNA-Expression der Steroidrezeptoren signifikant beeinflusste und in den Gonaden extrem adverse Effekte hervorrief. Noch drastischer zeigte sich die Schädigung der Gametogenese durch MT. Hierbei wurden auf zellulärer Ebene tief greifende Veränderungen festgestellt bis hin zum Fehlen der Gonadenanlage. Wenn Oberflächenwasser mit den in dieser Studie gewählten AACs TPT, MT, CYP und VIN oder AACs mit ähnlichen Wirkungspotenzial belastet sind, könnte es zu dramatischen Einschnitten in Populationen von der in Europa endemisch vorkommenden *R. rutilus* kommen bis hin zur lokalen Extinktion. Wie hier erstmalig gezeigt werden konnte, sind einige der Substanzen in umweltrelevanten Konzentrationen eingesetzt worden oder haben diese sogar unterschritten. Im Fall von TPT zum Beispiel um ein Vielfaches weniger als die von Harino bestimmten Konzentrationen (Harino et al., 2000). Auch bei den antiandrogenen Substanzen zeigte sich, dass niedrigere Konzentrationen (wie hier  $10^{-8}$  M) als in der Umwelt gefundene Konzentrationen von antiandrogenen Flutamid-Äquivalenten ( $10^{-6}$  M; Urbatzka et al., 2007) zu adversen Effekten bei der Gametogenese von *R. rutilus* führen. Weitere Untersuchungen zu Auswirkungen von AACs auf die Sexualdifferenzierung und Gametogenese sind daher zwingend notwendig sowohl bei Modellorganismen wie auch bei endemischen Spezies.

### 4.3 In vivo Exposition mit adulten *R. rutilus*

#### 4.3.1 Mortalitaet

Die Mortalitaetsrate betrug bei allen verwendeten Substanzen waehrend der vierzehntaegigen Exposition von 2+ *R. rutilus* 0,0%. Dies ist vergleichbar zu aehnlichen Studien mit *Pimephales promelas* (Ankley et al. 2002; Panther et al. 2004). Der Vergleich mit den Expositionen der larvalen *R. rutilus* (EX1 und EX2) zeigt, dass auch hier die Haelterung unter nahezu optimalen Bedingungen stattgefunden hat und ein Einfluss auf die Kondition der Tiere durch die Haelterung ausgeschlossen werden kann.

#### 4.3.2 Genexpression der Biomarker bei adulten *R. rutilus*

Wie auch bei den larvalen *R. rutilus* zeigte sich, dass MT in den Gehirnen maennlicher Tiere die Expression der ARO-mRNA um ca. das 3-fache im Vergleich zur SoCo steigert. Alle anderen Substanzen fuehrten zu keiner Beeinflussung der Genexpression der ARO-mRNA. Ebenso kam es wie bei den larvalen Tieren durch die Exposition mit den oben beschriebenen Substanzen zu keiner signifikanten Beeintraechtigung der Expression der LH-mRNA und der FSH-mRNA in den Gehirnen der adulten *R. rutilus* beider Geschlechter.

Die Beeinflussung der ARO-mRNA durch ein kuenstliches Androgen koennte bei laengerer Exposition ein Mechanismus sein, der, wie bei den larvalen Tieren in dieser Studie nachgewiesen, zur Vermaennlichung weiblicher Tiere fuehren kann. Eine dauerhafte Kontamination mit kuenstlichen Androgenen veraendert auch bei adulten Tieren ueber ein negatives Feedback die normale Homoeostase der HHG. Auffaellig bei der Exposition der adulten *R. rutilus* im Vergleich zu der der larvalen Tiere ist, dass es nur in zwei Faellen zu einer signifikanten Aenderung der mRNA-Expression kam, naemlich der Inhibierung der ER-mRNA in der Leber weiblicher Tiere und der Abnahme der AR-mRNA in den Gonaden weiblicher Tiere durch MT.

Dies laesst die Schlussfolgerung zu, dass adulte Tiere, die ueber einen kurzen Zeitraum AACs ausgesetzt sind, zunaechst wenig Effekte auf die HHG zeigen, da der Koerper in der Lage zu sein scheint, das durch exogene Stoffe hervorgerufene Ungleichgewicht bei den hier angewandten Konzentrationen von  $0,5 \cdot 10^{-9}$  M bis  $10^{-8}$  M effizient zu kompensieren. Larvale *R. rutilus* hingegen sind weitaus empfindlicher und deutlich mehr gefaehrdet adverse Effekte durch AACs zu erhalten. Fuer die weitere Diskussion sei hier nochmals darauf hingewiesen, dass die LH-mRNA-Expression und die FSH-mRNA-Expression weder bei den adulten noch bei den larvalen Tieren eine signifikante Veraenderung gegenueber der SoCo zeigte.

#### 4.3.3 Enzymassays nach in vivo Kurzzeitexposition mit AACs

Nach vierzehntaegiger Exposition zeigte sich keine signifikante Beeintraechtigung der Aromataseaktivitaet in den Gehirnen der weiblichen 2+ *R. rutilus* durch die eingesetzten AACs im Vergleich zur SoCo. Bei den maennlichen Tieren zeigte sich, dass MT die Aromataseaktivitaet in den Gehirnen steigert. Dies korreliert mit den in dieser Arbeit gezeigten Ergebnissen aus der Bestimmung der ARO-mRNA-Expression. Hier steigerte MT die Expression der ARO-mRNA im Gehirn ausschliesslich bei den maennlichen 2+ Tieren. Durch die Enzymassays wurden die gezeigten Ergebnisse der Genexpression bestaetigt und auch hier kommt es nur bei den maennlichen Tieren durch das vermehrte Vorhandensein von MT zu einer Gegenregulation, um den androgenen Steroidhaus-

halt zu regulieren. Bei den Weibchen kommt es durch den im Verhaeltnis zu den Maennchen hoeheren Oestrogenspiegel zu keiner Gegenregulation, da sich das Verhaeltnis von Oestrogenen zu Androgenen nur geringfuegig aendert. Maennliche Tiere haben deutlich mehr Androgen als Oestrogen. Durch die Exposition mit MT wird das Verhaeltnis drastischer gestoert als in den Weibchen und durch das vermehrte Angebot an Substrat kommt es zu einem Anstieg der Aromataseaktivitaet, die einhergeht mit der gesteigerten Expression der ARO-mRNA in maennlichen *R. rutilus* Gehirnen. TPT zeigte keine Beeinflussung der Aromataseaktivitaet genauso wie VIN.

In den Gehirnen von maennlichen 2+ *R. rutilus* fuehrte LET zu einer signifikanten Hemmung der Aromataseaktivitaet. Aus der Literatur ist bekannt, dass FEN, ein Aromatasehemmer, bei *C. carpio* die Aktivitaet des Enzyms senkte (Thibaut und Porte, 2004). LET, der in dieser Studie verwendete Aromatasehemmer, reduzierte die Aktivitaet von ARO bei Regenbogenforellen (*Oncorhynchus mykiss*) um 90% (Shilling et al. 1999). Der Mechanismus, der zu dieser Hemmung fuehrt, ist noch nicht geklaert. Die innerhalb dieser Arbeit gewonnen Ergebnisse lassen vermuten, dass dieser Effekt der Hemmung der Aromataseaktivitaet durch den Aromatasehemmer LET vermutlich bei allen Teleosteen zu finden sein wird.

#### 4.3.4 Sexualsteroidspiegel im Blut von 2+ *R. rutilus* nach in vivo Kurzzeitexposition mit AACs

Obwohl TPT nicht in der Bindungstasche des AR bindet, besitzt diese Substanz eine potenzielle androgene Wirkung. Durch Hemmung der Steroidsynthese fuehrte TPT zu einer signifikanten Erniedrigung von E2 im Blutplasma adulter weiblicher *R. rutilus*. Bei den maennlichen 2+ *R. rutilus* ist der natuerliche E2-Spiegel im Plasma schon weitaus geringer als bei den Weibchen, so dass eine Erniedrigung nicht signifikant nachweisbar war.

Das Androgen MT senkte die Konzentrationen von E2 und 11-KT im Blutplasma beider Geschlechter im Vergleich zur SoCo nach 14-taegiger Exposition. Dies ist durch den Mechanismus des negativen Feedbacks zu erklaren (Kloas und Lutz, 2006). Bedingt durch das Vorhandensein von MT kommt es zu einer vermehrten Bindung an die AR in den Zielorganen sowie in den hoeher regulierenden Zentren des Hypothalamus und der Hypophyse. Durch das negative Feedback wuerde man bei *R. rutilus* eine Hemmung der Induktion der gonadotropen Hormone der Hypophyse erwarten. Dies ist in diesem Versuch nicht zu belegen gewesen. Allerdings wurde durch Harris et al. (2001) gezeigt, dass es zu einer zyklischen Ausschuettung des Sexualsteroids LH bei Regenbogenforellen (*O. mykiss*) kommt und sich nach 18 Wochen keine Unterschiede zu den Tieren aus der Kontrollgruppe mehr zeigen. Dies angenommen und mit dem Umstand kombiniert, dass nur zum Ende der Exposition die mRNA der gonadotropen Hormone bestimmt wurde, laesst die Schlussfolgerung zu, dass die Gegenregulation zu diesem Zeitpunkt noch nicht oder nicht mehr ueber die Ausschuettung von LH und FSH geregelt wurde. Es kommt wahrscheinlich zu einer fruehzeitigen Hemmung der Sekretion von LH und FSH, die im Verhaeltnis zur SoCo nach 14 Tagen nicht signifikant nachweisbar ist. Da LH und FSH nicht ausgeschuettet werden, kommt es zu einer Gegenregulation in Form einer vermehrten Produktion von Aromatase im Gehirn von *R. rutilus*. Dies wurde durch die Messung der Enzymaktivitaet bestaetigt.

Die vierzehntaegige Exposition adulter *R. rutilus* zeigt, dass auf der Ebene der Gonadotropine zu diesem Zeitpunkt keine Aenderung der mRNA-Expression stattfand. Ebenfalls gab es nur vereinzelte geringfuegige Aenderungen in der Expression von ER und AR, die in der Leber gemessen wurden. Dagegen sind nach 14 Tagen die

Steroidspiegel im Plasma der Fische durch MT drastisch gesenkt worden und im Gehirn kommt es zu einer Steigerung der Aromatasesynthese, bedingt durch negatives Feedback. Wurde man die Exposition weiterfuehren, duerfte man wohl nach einiger Zeit bei den adulten Tieren massive adverse Effekte auf die Gametogenese erkennen, die den Fortbestand einer Population stark gefaehrden koennten.

#### 4.4 Fazit

Die Auswirkungen von AACs auf *R. rutilus* wurden auf verschiedenen Untersuchungsebenen (morphologische Parameter, Geschlechterverhaeltnis, EIA, mRNA-Expression, Sexualsteroidspiegel im Blutplasma, Histologie) in dieser Studie erstmalig gezeigt.

Hierbei zeigte sich, dass besonders die histologischen Untersuchungen eine sensitive Nachweismethode fuer die Wirkung von AACs sind. Die Expositionen von *R. rutilus* mit TPT, CYP, MT und VIN fuehrten zu adversen Effekten in der Gonadenentwicklung. Bei den Untersuchungen der molekularen Biomarker zeigten sich diverse Effekte. Vor allem die TPT exponierten Tiere zeigten auf molekularer Ebene deutliche Unterschiede zur SoCo. Allerdings bestaetigen die untersuchten Biomarker nicht die physiologischen Veraenderungen der Testes der Fische. Es ist somit zu vermuten, dass hier ein anderer Wirkmechanismus durch TPT vorliegt, als durch die Biomarker gezeigt werden konnte. Im Gegensatz dazu korrelieren die drastischen Veraenderungen der MT behandelten maennlichen *R. rutilus* mit der Erhoehung von ARO (mRNA-Epression und Enzymassay), der AR-mRNA-Expression in der Leber, sowie der verringerten Level der Sexualsteroiden (11-KT, E2). *R. rutilus* wurde in dieser Studie als ein gutes Modell zur Untersuchung von AACs etabliert.

## 5 Aussichten

Die verschiedenen Versuchsansätze, die hier in dieser Arbeit durchgeführt wurden, zeigen, dass die Kontamination von Oberflächengewässern mit AACs zu drastischen Schäden in einer Fischart führen kann. War der Fokus der Wissenschaft bisher auf die verheerenden Auswirkungen von (anti)oestrogen wirksamen Substanzen auf aquatisch lebende Tiere gerichtet und durch zahlreiche Publikation belegt worden, so zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit, dass es genauso wichtig ist den Fokus zusätzlich auf AACs zu richten und in dieser Richtung weiter zu forschen. Es wäre daher wünschenswert mit dem in dieser Arbeit eingeführten Modell *R. rutilus* einen „full lifecycle test“ durchzuführen. Das heißt, Expositionsexperimente durchzuführen mit AACs von der Fertilisation bis zur Fekundität eines Fisches/einer Population. Neben der Tatsache, dass es sich um einen sehr aufwendigen Versuch handeln würde, hat man festgestellt, dass 2+ *R. rutilus*, die man unter gleich bleibenden Bedingungen über zwei Jahre in einer Aquarienhalle gehalten hat, noch eine innere Saisonalität aufweisen aber nie gelaicht haben (persönliche Mitteilung: Hoelker, IGB, Berlin). Um trotzdem Aussagen über den Einfluss von AACs auf das Hormonsystem von *R. rutilus* unter saisonalen Bedingungen stellen zu können, würde sich ein partieller „lifecycle test“, wie hier zum Teil durchgeführt, empfehlen. Hierzu könnten die Fische kontrolliert im Freiland gezüchtet werden, um dann zu der jeweiligen Saison dem Expositionsregime zugeführt zu werden. Somit könnte gezeigt werden ob und wie sich die Saisonalität auf die Wirkungen der AACs auf das Hormonsystem der Fische auswirkt. Weiterhin hätte dies den Vorteil, dass man so gewonnene Resultate mit Ergebnissen aus Expositionen von „Laborfischen“ wie dem Zebrafisch (*Danio rerio*) oder der Dickkopfelritze (*Pimephales promelas*) vergleichen könnte. Eventuelle Unterschiede könnten somit neue Erkenntnisse erbringen, um den Schutz einheimischer Fische zu optimieren. Diese Expositionen sollten dann auch in modernen Durchflussanlagen durchgeführt werden, wie es derzeit Standard in der oekotoxikologischen Forschung ist.

Eine größere Anzahl von neuen sensitiven Biomarkern müsste entwickelt werden. Die Trennung von Hypothalamus und Hypophyse zur Untersuchung verschiedener Biomarker wäre essentiell. Weiterhin sollte zur Detektierung ein spezifischer Sexmarker bei *R. rutilus* gefunden werden, um genauere Aussagen über Intersex, Hermaphroditismus und/oder Geschlechtsumwandlung machen zu können und dadurch einen wichtigen Biomarker für die Oekotoxikologie zu haben. Hierzu wurden bisher verschiedene SOX-Gene (sex-determining region Y-like-box) und DMRT1 (Double Sex - Map Related Transcription Factor 1) als spezifische Primer mit den Methoden der RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) und ISSR (Inter-Simple Sequence Repeats) ausgetestet, ohne bisher einen Marker zu finden, (unendliche Mitteilung: Wurtz, IGB, Berlin). Weitere spezifische Marker und die Methode der ALFP (Amplified Fragment Length Polymorphism) sollten noch getestet werden.

Die Beeinflussung von Hormonsystem, Schilddrüsensystem und Immunsystem durch AACs, sollte parallel an diesem Modell weiter entwickelt und etabliert werden, wie es teilweise in der Arbeitsgruppe „endocrine disruptors“ am Leibniz-Institut für Gewässerökologie und Binnenfischerei in Berlin schon stattfindet. All diese Untersuchungen sollten am besten mit *R. rutilus* durchgeführt werden, die unter kontrollierten, saisonal angepassten Bedingungen in einer Durchflussanlage in einem „full lifecycle test“ gegenüber verschiedenen AACs exponiert werden.

## Referenzen

- Amano, M.; Ikuta, K.; Kitamura, S. 2007: Effects of a gonadotropin-releasing hormone antagonist on gonadotropin levels in masu salmon and sockeye salmon. *J. Exp. Zool. Part A. Ecol. Genet. Physiol.* 25; [Epub ahead of print]
- Ankley, G.T.; Kahl, M.D.; Jensen, K.M.; Hornung, M.W.; Korte, J.J.; Makynen, E.A.; Leino, R.L. 2002: Evaluation of the Aromatase Inhibitor Fadrozole in a Short-Term Reproduction Assay with the Fathead Minnow (*Pimephales promelas*). *Toxicol. Sci.* 67: 121-130.
- Baattrup, E.; Junge, M. 2001: Antiandrogenic pesticides disrupt sexual characteristics in the adult male guppy *Poecilia reticulata*. *Environ. Health. Perspect.* 109(10): 1063-70.
- Bauer, E.R.; Meyer, H.H.; Stahlschmidt-Allner, P.; Sauerwein, H. 1998: Application of an androgen receptor assay for the characterisation of the androgenic or antiandrogenic activity of various phenylurea herbicides and their derivatives. *Analyst.* 123(12): 2485-7.
- Beato, M.; Herrlich, P.; Schuetz, G. 1995: Steroid hormone receptors: Many actors in searching a plot. *Cell* 83: 851-857.
- Boegi, C.; Levy, G.; Lutz, I.; Kloas, W. 2002: Functional genomics and sexual differentiation in amphibians. *Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol.* 133(4): 559-70.
- Bucke, D. und Waterman, B. 1988: Effects of pollutants on fish. In "Pollution of the North Sea, an assessment", pp. 612-623. Springer Verlag, Berlin.
- Byrne, B. C.; Li, J. J.; Sninsky, J.; Poiesz, B. J. 1988: Detection of HIV-1 RNA sequences by in vitro DNA amplification. *Nucleic Acids Res.* 16: 4165-4170.
- Carson, R. 1962. „The Silent Spring“ Houghton Mifflin, USA.
- Carter, V.; Pierce, R.; Dufour, S.O.; Arme, C.O.; Hoole, D. 2005: The tapeworm *Ligula intestinalis* (Cestoda: Pseudophyllidea) inhibits LH expression and puberty in its teleost host, *Rutilus rutilus*. *Reproduction* 130(6): 939-45.
- Christiaens, V.; Berckmans, P.; Haelens, A.; Witters, H.; Claessens, F. 2005: Comparison of different androgen bioassays in the screening for environmental (anti)androgenic activity. *Environ. Toxicol. Chem.* 24(10): 2646-2656.
- Colborn T, Clement C, eds. 1992. Advances in Modern Environmental Toxicology. Vol. XXI. In: Chemically Induced Alterations in Sexual and Functional Development: The Wildlife/Human Connection. Princeton NJ: Princeton Scientific.
- Colborn, T., vom Saal, F. S., Soto, A. M. 1993: Developmental effects of endocrine-disrupting chemicals in wildlife and humans. *Environ. Health. Perspect.* 101(5): 378-384.

- Duft, M.; Schmitt, C.; Bachmann, J.; Schulte-Oehlmann, U.; Oehlmann, J. 2007: Prosobranch snails as test organisms for the assessment of endocrine active chemicals - an overview and a guideline proposal for a reproduction test with the freshwater mudsnail *Potamopyrgus antipodarum*. *Ecotoxicol.* 16(1): 169-82.
- Dostal, D.; Rothblum, K.; Bahu, K. 1994: An improved method for absolute quantification of mRNA using multiplex polymerase chain reaction. *Anal. Biochem.* 223: 239-250.
- Evanson, M., v.d.Kraak, G. J. 2001: Stimulatory effects of selected PAHs on testosterone production in goldfish and rainbow trout and possible mechanisms of action. *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.* 130(2): 249-258.
- Fang, H.; Tong, W.; Branham, W.S.; Moland, C.L.; Dial, S.L.; Hong, H.; Xie, Q.; Perkins, R.; Owens, W.; Sheehan D.M. 2003: Study of 202 natural, synthetic, and environmental chemicals for binding to the androgen receptor. *Chem. Res. Toxicol.* 16(10): 1338-58.
- Fenske, M.; Segner, H. 2004: Aromatase modulation alters gonadal differentiation in developing zebrafish (*Danio rerio*). *Aquat Toxicol.* 67(2): 105-26.
- Fent, K.; Meier, W. 1994: Effects of triphenyltin on fish early life stages. *Arch Environ Contam Toxicol.* 27(2): 224-31.
- Gunderson, M.P.; LeBlanc, G.A.O.; Guillette, L.J. Jr. 2001: Alterations in sexually dimorphic biotransformation of testosterone in juvenile American alligators (*Alligator mississippiensis*) from contaminated lakes. *Environ. Health Perspect.* 109: 1257-1264.
- Harino, H.; Fukushima, M.; Kawai, S. 2000: Accumulation of butyltin and phenyltin compounds in various fish species. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 39(1): 13-9.
- Harris, C.A.; Santos, E.M.; Janbakhsh, A.; Pottinger, T.G.; Tyler, C.R.; Sumpter, J.P. 2001: Nonylphenol affects gonadotropin levels in the pituitary gland and plasma of female rainbow trout. *Environ. Sci. Technol.* 35(14): 2909-16.
- Heneweer, M., van den Berg, M., Sanderson, J. T. 2004: A comparison of human H295R and rat R2C cell lines as in vitro screening tools for effects on aromatase. *Toxicol. Lett.* 146: 183-94.
- Hill, R.L.; Janz, D.M. 2003: Developmental estrogenic exposure in zebrafish (*Danio rerio*): I. Effects on sex ratio and breeding success. *Aquatic Toxicol.* 63: 417-429.
- Horiguchi, T. 2006: Masculinization of female gastropod mollusks induced by organotin compounds, focusing on mechanism of actions of tributyltin and triphenyltin for development of imposex. *Environ Sci.* 13(2): 77-87.
- Iwamatsu, T.; Kobayashi, H.; Sagegami, R.; Shuo, T. 2006: Testosterone content of developing eggs and sex reversal in the medaka (*Oryzias latipes*). *Gen Comp Endocrinol.* 145(1): 67-74.



- Janer, G.; Lyssimachou, A.; Bachmann, J.; Oehlmann, J.; Schulte-Oehlmann, U.; Porte, C. 2006: Sexual dimorphism in esterified steroid levels in the gastropod *Marisa cornuarietis*: the effect of xenoandrogenic compounds. *Steroids*. 71(6): 435-44.
- Jobling, S.; Coey, S.; Whitmore, J.G.; Kime, D.E.; van Look, K.J.; McAllister, B.G.; Beresford, N.; Henshaw, A.C.; Brighty, G.; Tyler, C.R.; Sumpter, J.P. 2002: Wild intersex roach (*Rutilus rutilus*) have reduced fertility. *Biol Reprod*. 67(2): 515-24.
- Katsiadaki, I.; Scott, A.P.; Hurst, M.R.; Mathiessen, P.; Mayer, I. 2002: Detection of environmental androgens: a novel method based on enzyme-linked immunosorbent assay of spiggin, the stickleback (*Gasterosteus aculeatus*) glue protein. *Environ Toxicol Chem*. 2002 Sep; 21(9): 1946-54.
- Katsiadaki, I.; Morris, S.; Squires, C.; Hurst, M.R.; James, J.D.; Scott, A.P. 2006: Use of the three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus*) as a sensitive in vivo test for detection of environmental antiandrogens. *Environ. Health Perspect*. 114 Suppl 1: 115-21.
- Katsu, Y.; Lange, A.; Urushitani, H.; Ichikawa, R.; Paull, G.C.; Cahill, L.L.; Jobling, S.; Tyler, C.R.; Iguchi, T. 2007: Functional associations between two estrogen receptors, environmental estrogens, and sexual disruption in the roach (*Rutilus rutilus*). *Environ. Sci. Technol*. 41(9): 3368-74.
- Kelce, W.R.; Monnosson, E.; Gamcsik, M.P.; Laws, S.C.; Gray, L.E.Jr. 1994: Environmental hormone disruptors: evidence that vinclozolin developmental toxicity is mediated by antiandrogenic metabolites. *Toxicol. Appl. Pharmacol*. 126(2): 276-85.
- Kelce, W.R.; Gray, L.E.; Wilson, E.M. 1998: Antiandrogens as environmental endocrine disruptors. *Reprod. Fertil*. 10(1): 105-11.
- Kiparissis, Y.; Metcalfe, T.L.; Balch, G.C.; Metcalfe, C.D 2003: Effects of the antiandrogens, vinclozolin and cyproterone acetate on gonadal development in the Japanese medaka (*Oryzias latipes*). *Aquat. Toxicol*. 63(4): 391-403.
- Kitano, T.; Takamune, K.; Nagahama, Y.; Abe, S. 2000: Aromatase inhibitor and 17 $\alpha$ -methyltestosterone cause sex-reversal from genetical females to phenotypic males and suppression of P450 aromatase gene expression in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Mol. Reprod. Dev*. 56(1): 1-5.
- Kloas, W.; Schrag, B.; Ehnes, C.; Segner, H. 2000: Binding of xenobiotics to hepatic estrogen receptor and plasma sex steroid binding protein in teleost fish, the common carp (*Cyprinus carpio*). *Gen. Comp. Endocrinol*. 119(3): 287-299.
- Kloas, W. 2002: Amphibians as a model for the study of endocrine disruptors. *Int. Rev. Cytol*. 216: 1-57. Review.
- Kloas, W.; Lutz, I. 2006: Amphibians as model to study endocrine disruptors. *J. Chromatogr. A*. 1130(1): 16-27.
- Kusk, K.O.; Wollenberger, L. 2007: Towards an internationally harmonized test method for reproductive and developmental effects of endocrine disruptors in marine copepods. *Ecotoxicology*. 16(1): 183-95.

- Lavado, R.; Thibaut, R.; Raldua, D.; Porte, C. 2004: First evidence of endocrine disruption in feral carp from the Ebro River. *Toxicol Appl Pharmacol.* 196(2): 247-57.
- Liney, K.E.; Jobling, S.; Shears, J.A.; Simpson, P.; Tyler, C.R. 2005: Assessing the sensitivity of different life stages for sexual disruption in roach (*Rutilus rutilus*) exposed to effluents from wastewater treatment works. *Environ. Health Perspect.* 113(10): 1299-307.
- Liney, K.E.; Hagger, J.A.; Tyler, C.R.; Depledge, M.H.; Galloway, T.S.; Jobling, S. 2006: Health Effects in Fish of Long-Term Exposure to Effluents from Wastewater Treatment Works. *Environ. Health Perspect.* 114(1): 81-9.
- Lloyd, R. und Tooby, T.E., 1979: New terminology required for short-term static fish bioassays: LC (I)50. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 22(1-2): 1-3.
- Lutz, I.; Kloas, W. 1999: Amphibians as a model to study endocrine disruptors: I. Environmental pollution and estrogen receptor binding. *Sci. Total Environ.* 225 (1-2): 49-57.
- Mason, J. I., Carr, B. R., Murry, B. A. 1987: Imidazole antimycotics: Selective inhibitors of steroid aromatization and progesterone hydroxylation. *Steroids* 50, 179–189.
- Mateos, J.; Mananos, E.; Carrillo, M.; Zanuy, S. 2002: Regulation of follicle-stimulating hormone (FSH) and luteinizing hormone (LH) gene expression by gonadotropin-releasing hormone (GnRH) and sexual steroids in the Mediterranean Sea bass. *Comp. Biochem. and Physiol. B-Biochem. & Molec. Biol.* 132: 75-86.
- Nakanishi, T., Nishikawa, J., Tanaka, K. 2006: Molecular targets of organotin compounds in endocrine disruption: do organotin compounds function as aromatase inhibitors in mammals? *Environ. Sci.* 13(2): 89-100. Review.
- Nash, J.P.; Kime, D.E.; van der Ven, L.; Wester, P.; Brion, F.; Maack, G.; Stahlschmidt-Allner, P.; Tyler, C.R. 2004: Long-Term Exposure to Environmental Concentrations of the Pharmaceutical Ethynylestradiol Causes Reproductive Failure in Fish. *Environ. Health Perspect.* 112(17): 1725-33.
- Norris, D.O., 1997: *Vertebrate Endocrinology*, Third Edition, Academic Press, San Diego.
- Oehlmann, J.; Schulte-Oehlmann, U.; Tillmann, M.; Markert, B. 2000: Effects of endocrine disruptors on prosobranch snails (Mollusca: Gastropoda) in the laboratory. Part I: Bisphenol A and octylphenol as xenoestrogens. *Ecotox.* 9(6): 383-97.
- Oehlmann, J.; Schulte-Oehlmann, U.; Bachmann, J.; Oetken, M.; Lutz, I.; Kloas, W.; Ternes, T.A. 2006: Bisphenol A induces superfeminization in the ramshorn snail *Marisa cornuarietis* (Gastropoda: Prosobranchia) at environmentally relevant concentrations. *Environ. Health Perspect.* 114 *Suppl 1*: 127-33.
- Opitz, R., Levy, G., Boegi, C., Lutz, I., Kloas, W. 2002: Endocrine disruption in fish and amphibians. *Recent. Res. Devel. Endocrinol.* 3: 127-170.

- Orn, S.; Holbech, H.; Madsen, T.H.; Norrgren, L.; Petersen, G.I. 2003: Gonad development and vitellogenin production in zebrafish (*Danio rerio*) exposed to ethinylestradiol and methyltestosterone. *Aquat. Toxicol.* 65(4): 397-411.
- Panther, G.H.; Hutchinson, T.H.; Hurd, K.S.; Sherren, A.; Stanley, R.D.; Tyler, C.R. 2004: Successful detection of (anti-)androgenic and aromatase inhibitors in pre-spawning adult fathead minnows (*Pimephales promelas*) using easily measured endpoints of sexual development. *Aquatic Toxicol.* 70(1): 11-21.
- Papoulias, D.M.; Noltie, D.B.; Tillit D.E. 2000: Effects of methyl testosterone exposure on sexual differentiation in medaka, *Oryzias latipes*. *Mar. Environ. Res.* 50(1-5): 181-4.
- Pawlowski, S.; Sauer, A.; Shears, J.A.; Tyler, C.R.; Braunbeck, T. 2004: Androgenic and estrogenic effects of the synthetic androgen 17alpha-methyltestosterone on sexual development and reproductive performance in the fathead minnow (*Pimephales promelas*) determined using the gonadal recrudescence assay. *Aquat. Toxicol.* 68(3): 277-91.
- Rehage, J.S.; Scott, G.L.; Hammond, J.I.; Palmer, D.P.; Sih, A. 2000: Effects of larval exposure to triphenyltin on the survival, growth, and behavior of larval and juvenile *Ambystoma barbouri* salamanders. *Environ Toxicol Chem.* 21(4):807-15.
- Risher, J.F.; Mink, F.L.; Stara, J.F. 1987: The toxicologic effects of the carbamate insecticide aldicarb in mammals: a review. *Environ. Health Perspect.* 72: 267-81. Review.
- Rudel, H.; Mueller, J.; Steinhanses, J.; Schroter-Kermani, C. 2007: Retrospective monitoring of organotin compounds in freshwater fish from 1988 to 2003: results from the German environmental specimen bank. *Chemosphere.* 66(10): 1884-94.
- Sanderson, J. T., Boerma, J., Lansbergen, G. W. A., van den Berg, M. 2002: Induction and inhibition of aromatase (CYP19) activity by various classes of pesticides in H295R human adrenocortical carcinoma cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 182: 44-54.
- Schulte-Oehlmann, U.; Watermann, B.; Tillmann, M.; Scherf, S.; Markert, B.; Oehlmann, J. 2000: Effects of endocrine disruptors on prosobranch snails (Mollusca: Gastropoda) in the laboratory. Part II: Triphenyltin as a xeno-androgen. *Ecotox.* 9: 399-412.
- Schulz, W. R. und Miura, T. 2002: Spermatogenesis and its endocrine regulation. *Fish Phys. and Biochem.* 26: 43-56.
- Seki, M.; Yokota, H.; Matsubara, H.; Tadokoro, H.; Kobayashi, K. 2004: Fish full life-cycle testing for androgen methyltestosterone on medaka (*Oryzias latipes*). *Environ. Toxicol. Chem.* 23(3): 774-81.
- Shilling, A.D.; Carlson, D.B.; Williams, D.E. 1999: Rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, as a model for aromatase inhibition. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 70(1-3): 89-95.
- Sohn, Y.C.; Yoshiura, Y.; Kobayashi, M.; Aida, K. 1998: Effect of sex steroids on the mRNA levels of gonadotropin I and II subunits in the goldfish *Carassius auratus*. *Fisheries Sci.* 64: 715-721.

- Suna, L.; Zha, J.; Spear, P.A.; Wang, Z. 2007: Toxicity of the aromatase inhibitor letrozole to Japanese medaka (*Oryzias latipes*) eggs, larvae and breeding adults. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol.* 2007 Feb 22; [Epub ahead of print].
- Thibaut, R. und Porte, C. 2004: Effects of endocrine disrupters on sex steroid synthesis and metabolism pathways in fish. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 92(5): 485-94.
- Tillmann, M.; Schulte-Oehlmann, U.; Duft, M.; Markert, B.; Oehlmann, J. 2001: Effects of endocrine disruptors on prosobranch snails (Mollusca: Gastropoda) in the laboratory. Part III: Cyproterone acetate and vinclozolin as antiandrogens. *Ecotox.* 10(6): 373-88.
- Urbatzka, R.; Lutz, I.; Opitz, R.; Kloas, W. 2006: Luteinizing hormone, follicle stimulating hormone, and gonadotropin releasing hormone mRNA expression of *Xenopus laevis* in response to endocrine disrupting compounds affecting reproductive biology. *Gen. Comp. Endocrinol.* 146(2): 119-25.
- Urbatzka, R.; van Cauwenberge, A.; Maggioni, S.; Vigano, L.; Mandich, A.; Benfenati, E.; Lutz, I.; Kloas, W. 2007: Androgenic and antiandrogenic activities in water and sediment samples from the river Lambro, Italy, detected by yeast androgen screen and chemical analyses. *Chemosphere.* 67(6): 1080-7.
- van Aerle, R.; Nolan, T.M.; Jobling, S.; Christiansen L.B.; Sumpter, J.P.; Tyler, C.R. 2001: Sexual disruption in a second species of wild cyprinid fish (the gudgeon, *Gobio gobio*) in United Kingdom freshwaters. *Environ. Toxicol. Chem.* 20(12): 2841-7.
- Vinggaard, A. M., Jacobsen, H., Metzdorff, S. B., Andersen, H. R., Nellemann, C. 2005: Antiandrogenic effects in short-term in vivo studies of the fungicide fenarimol. *Toxicol.* 207: 21–34.
- vom Saal, F.S., 1979: Cyproterone acetate exposure during gestation in mice retards fetal growth. *Physiol. Behav.* 21(4): 515-7.
- Wang, A. M.; Doyle, M. V.; Mark, D. F. 1989: Quantitation of mRNA by the polymerase chain reaction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 9717-9721.
- Wong, C.I.; Kelce, W.R.; Sar, M.; Wilson, E.M. 1995: Androgen receptor antagonist versus agonist activities of the fungicide Vinclozolin relative to hydroxyflutamide. *J. Biol. Chem.* 270: 19998–20003.
- Yamabe, Y.; Hoshino, A.; Imura, N.; Suzuki, T.; Himeno, S. 2000: Enhancement of androgen-dependent transcription and cell proliferation by tributyltin and triphenyltin in human prostate cancer cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 169(2): 177-84.
- Zarn, J. A., Brueschweiler, B. J., Schlatter, J. R. 2003: Azole fungicides affect mammalian steroidogenesis by inhibiting sterol 14a-demethylase and aromatase. *Environ. Health Perspect.* 111: 255–261.

## Abkuerzungen und Akronyme

[<sup>3</sup>H]-T = Tritium - Testosteron

11-KT = 11-Keto-Testosteron

AAC = (Anti)androgene Substanzen

Abb. = Abbildung

AchE = Acetylcholinesterase

ARO = Aromatase

BPA = Bisphenol A

COMPRENDO = Comperative Research of Endocrine Disruptors

CYP = Cyproteronazetat

DDT = Dichlordiphenyltrichloraethan

DMRT1 = Double Sex - Map Related Transcription Factor 1

DNA = Desoxyribonukleinsaeure

dpm = „dots per minute“

E2 = 17β-Oestradiol

ED(s) = endocrine disruptor(s)

EF = Elongationsfaktor 1α

EIA = EnzymImmunoAssay

ERE = E2 -responsive Elemente

*et al.* = *et alii*

EX1 = erste Exposition larvaler *R. rutilus*

EX2 = zweite Exposition larvaler *R. rutilus*

FEN = Fenarimol

FSH = Follikel stimulierende Hormon

GnRH = Gonadotropin-releasing Hormon

HE = Haematoxylin-Eosin

HHG = Hypothalamus-Hypophysen-Gonaden-Achse

HVL = Hypophysenvorderlappen

IC<sub>50</sub> = „inhibiting concentration 50 percent“

IGB = Leibniz-Institut fuer Gewaesseroekologie und Binnenfischerei

IgG = Immunglobulin G

IZ = interstitiellen (Leydigschen) Zellen

L = Liter

LC<sub>50</sub> = lethal concentration 50%

LET = Letrozol

LH = Luteinisierende Hormon

Lsg = Loesung

mRNA = messenger-Ribonukleinsaeure

MT = Methyltestosteron

NB = „nonspecific binding“ – unspezifische Bindung

OECD = Organisation for Economic Co-operation and Development

p, p'-DDE = Dichlordiphenyldichlorethylen

PAK = polychlorierte Kohlenwasserstoffe

PAN = Pesticide Action Network

PCB = polychlorierte Biphenyle

RARA = Radiorezeptorassay

RT-PCR = Reverse Transcriptase-Polymerase Ketten Reaktion

SB = „specific binding“ – spezifisch gebundene Ligandenmenge

SBP = Sexualsteroid bindende Protein

Seq = Sequenz

SoCo = Loesungsmittelkontrolle

SOX = SRY-like-box

SRY = sex-determining region Y

T = Testosteron

Tab. = Tabelle

TAM = Tamoxifen

TB = „total binding“ – Gesamtbindung

TPT = Triphenylzinn

Tris = Tris(hydroxymethyl)-aminomethan

UBA = Umweltbundesamt

VIN = Vinclozolin

z. B. = zum Beispiel

ZNS = Zentrales Nervensystem

## Danksagung

Ich danke all meinen Kollegen am Institut fuer Gewaesseroekologie und Binnenfischerei in Berlin fuer Ihre Unterstuetzung waehrend meiner Doktorarbeit und eine sehr schoene Zeit, die ich sicher vermissen werde.

Mein spezieller Dank gilt:

Prof. Dr. Werner Kloas fuer die Bereitstellung des Forschungsthemas, konstruktiven Diskussionen, wissenschaftliche Unterrichtung und Unterstuetzung waehrend der Doktorarbeit. Weiterhin fuer sein Vertrauen mich in einem internationalen Projekt zu integrieren.

Prof. Dr. Helmut Segner und Prof. Dr. Joerg Oehlmann fuer Ihre Unterstuetzung und Ihre Bereitschaft diese Arbeit zu beurteilen.

Meiner Arbeitsgruppe (Ralph Urbatzka, Oana Jagnytsch, Ilka Lutz, Claudia Lorenz, Caterina Wiedemann, Antje Tillack, Wibke Schumacher, Ingo Cuppock, Achim Trubiroha, Bjoern Hermelink, Marcel Simon, Constanze Pietsch, Nadja Neumann, Klaus Knopf, Bernhard Rennert, Robert Opitz und Sven Wuertz) fuer die immer gute Zusammenarbeit und fuer Ihre Art der Wissenschaft auch eine lustige Seite abzugewinnen.

Ilka und Claudia fuer den morgendlichen Kaffee und das Laecheln fuer den Tag.

Ralph fuer eine schoene Reise nach Italien zum Fluss Lambro mit vielen neuen wissenschaftlichen und nicht wissenschaftlichen Erkenntnissen.

Robert fuer viele Ratschlaege und neue Musik.

Matti, dem besten Fischer von der ganzen Welt.

Allen Mitstreitern des EU-Projektes COMPRENDO in dessen Rahmen diese Arbeit entstanden ist.

Dr. Burkhard Waterman (Limnomar, Hamburg) fuer die histologische Aufarbeitung der Proben und fuer seine freundliche Unterstuetzung.

Meinen Eltern, Geschwistern und Freunden.

¡Ana mi corazón!